



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À SAÚDE

AIMÉE OBOLARI DURÇO

EFEITO CARDIOPROTETOR DO D-LIMONENO SOBRE O
INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO EM MODELO ANIMAL

LAGARTO - SE

2019

2019

AIMÉE OBOLARI DURÇO	EFEITO CARDIOPROTECTOR DO D-LIMONENO SOBRE O INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO EM MODELO ANIMAL	2019

AIMÉE OBOLARI DURÇO

**EFEITO CARDIOPROTETOR DO D-LIMONENO
SOBRE O INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO EM
MODELO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, da Universidade Federal de Sergipe como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. André Sales Barreto

LAGARTO - SE

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CAMPUS DE
LAGARTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Durço, Aimée Obolari

D953e Efeito cardioprotetor do d-limoneno sobre o infarto agudo do miocárdio
em modelo animal / Aimée Obolari Durço; orientador André Sales
Barreto. - Lagarto, 2019.

72 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Infarto Agudo do Miocárdio. 2. Estresse oxidativo. 3. D-limoneno. I.
Barreto, André Sales, Orient. II. Título.

CDU 61:616.12

AIMÉE OBOLARI DURÇO

**EFEITO CARDIOPROTETOR DO D-LIMONENO
SOBRE O INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO EM
MODELO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, da Universidade Federal de Sergipe como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Orientador: Prof. Dr. André Sales Barreto

1º Examinador: Prof. Dr. Felipe Rodrigues de Matos

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Carla Maria Lins de Vasconcelos

PARECER

Depois de tantos anos ao seu lado chega a
ser engraçado

A tristeza persistente quando você está
ausente - como se eu fosse adolescente!

Sabendo que palavras jamais seriam
suficientes, faço essa tentativa num repente

O fruto deste labor dedico ao meu amigo,
amante e amor,

Diego Santos de Souza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Jeová Deus, por ter conduzido tudo, desde o começo.

Agradeço à minha família - meu marido Diego; meus pais, Paulo e Maria do Carmo; minhas irmãs, Amã e Ariel e cunhado, Thassio. Amo vocês.

Agradeço à Luana, Thallita e Rodrigo, pela ajuda nos experimentos e pela paciência comigo! Aos colegas e professores do Laboratório de Biofísica do Coração (UFS), Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (UFS) e Laboratório de Membranas Excitáveis (UFMG), em especial à Professora Carla, por permitir que o trabalho fosse desenvolvido em seu laboratório e ao Professor Márcio, por disponibilizar recursos para o desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço ao meu orientador, Professor André, por ter me acolhido e acreditado, mesmo sem me conhecer. Hoje compreendo que não deve ter sido uma decisão fácil, assim, reitero o meu muito obrigada!

Agradeço aos amigos do mestrado – nunca houve, num mesmo grupo, tanta lamúria e risada.

Agradeço aos animais que morreram para que essa pesquisa fosse desenvolvida.

RESUMO

Efeito cardioprotetor do d-limoneno sobre o infarto agudo do miocárdio em modelo animal. Aimée Obolari Durço, Lagarto, 2019.

O infarto agudo do miocárdio (IM) apresenta alta taxa de mortalidade e sua abordagem - farmacológica ou percutânea - não inibe significativamente os danos do processo de isquemia/reperfusão (IR) ocasionados, dentre outros, pelo aumento do estresse oxidativo. As propriedades terapêuticas dos monoterpenos já são conhecidas e estudos já comprovaram que o d-limoneno – o monoterpeno natural mais frequente na natureza, possui capacidade antioxidante e ação hipotensora sobre a pressão sanguínea. Assim, o projeto buscou avaliar o efeito cardioprotetor do d-limoneno em modelo de IM em coração de camundongo Swiss. Para tanto, os animais foram divididos em 4 grupos: controle (veículo – salina 0,9%+DMSO 0,1%), infarto do miocárdio - IM (veículo + 150mg/kg isoproterenol), d-limoneno - DL (veículo + 10 μ M d-limoneno) e IM + DL (veículo + isoproterenol + d-limoneno) - as drogas foram administradas via intraperitoneal, em duas doses separadas por um intervalo de 24hs. No grupo IM + DL foi feita a administração do d-limoneno 30 minutos após a administração do isoproterenol. Assim, foram utilizados eletrodos subdérmicos para a caracterização do efeito do d-limoneno sobre as alterações eletrocardiográficas; investigação dos efeitos do d-limoneno sobre a área de infarto através da marcação com TTC; alterações histológicas pelo método de coloração com hematoxilina/eosina (H&E); produção das EROs pela fluorescência com DHE; avaliação da resposta do d-limoneno sobre as enzimas antioxidantes SOD e CAT; sua capacidade antioxidante (FRAP) e ação sobre as proteínas anti e pró-apoptóticas pelas técnicas de imunofluorescência e Western Blotting. Valores de probabilidade de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todos os dados foram expressos como média \pm Erro Padrão Médio (EPM), e o número de animais 5 - 6 por grupo. Os resultados mostraram que o d-limoneno impediu a elevação do segmento ST em 30% dos animais avaliados, impediu o aumento do intervalo QTc (de $71,66 \pm 6,604$ para $102,9 \pm 5,04$) e da FC ($332,7 \pm 20,96$ para $500,6 \pm 13,69$ bpm), reduziu a área de infarto para 8,34% e preveniu alterações histológicas nas fibras musculares cardíacas como descontinuidade, degeneração, espaçamento amplo e vacuolações, também diminuiu a infiltração de células mononucleares, diminuiu o estresse oxidativo por diminuir as EROs, restaurar a atividade da SOD a valores próximos ao controle ($24,35 \pm 3,87$ U/mg), diminuir a sulfidrilção, carbonilação e peroxidação lipídica, e suprimiu via pró-apoptótica reduzindo a expressão da Bax e a ativação da pro-caspase 3 a parâmetros iguais ao controle ($93,54 \pm 3,15$ e $100 \pm 2,37$, respectivamente). Assim, os achados farmacológicos do d-limoneno convergem para a diminuição do efeito pró-apoptótico pela redução de enzimas pró-apoptóticas, redução da área de infarto e produção de EROs e aumento da atividade da SOD.

Descritores: infarto agudo do miocárdio; estresse oxidativo; d-limoneno.

ABSTRACT

Cardioprotector effect of d-limonene on the myocardial infarction in animal model. Aimée Obolari Durço, Lagarto, 2019.

Acute myocardial infarction (MI) presents a high mortality rate and its approach - pharmacological or percutaneous - does not significantly inhibit the ischemia / reperfusion (RI) damage caused, among others, by the increase of oxidative stress. The therapeutic properties of monoterpenes are already known and studies have shown that d-limonene - the most common natural monoterpene in nature, has antioxidant capacity and hypotensive action on blood pressure. Thus, the project sought to evaluate the cardioprotective effect of d-limonene on the IM model in the heart of Swiss mice. The animals were divided into 4 groups: control (vehicle - saline 0.9% + DMSO 0.1%), myocardial infarction (vehicle + 150mg / kg isoproterenol), d - limonene - DL 10 μ M d-limonene) and IM + DL (vehicle + isoproterenol + d-limonene) - the drugs were administered intraperitoneally, in two separate doses over a 24 hours interval. In the IM + DL group, d-limonene was administered 30 minutes after isoproterenol administration. Thus, subdermal electrodes were used to characterize the effect of d-limonene on electrocardiographic alterations; investigation of the effects of d-limonene on the infarct area by TTC labeling; histological changes by hematoxylin/eosin staining method (H & E); production of EROs by fluorescence with DHE; evaluation of the response of d-limonene to the antioxidant enzymes SOD and CAT its antioxidant capacity (FRAP) and action on the anti and pro-apoptotic proteins by immunofluorescence and Western Blotting techniques. Values of probability of $p < 0.05$ were considered statistically significant. All data were expressed as mean \pm Standard Mean Error (SEM), and the number of animals 5-6 per group. The results showed that d-limonene prevented ST segment elevation in 30% of the evaluated animals, prevented the increase of the QTc ($71,66 \pm 6,604$ from $102,9 \pm 5,04$) and FC ($332,7 \pm 20,96$ from $500,6 \pm 13,69$ bpm) interval, reduced the infarct area to 8.34%, and prevented histological changes in muscle fibers as well as decreased mononuclear cell infiltration, decreased oxidative stress by decreasing the ROS, restoring the SOD activity to values close to the control (24.35 ± 3.87 U/mg), to decrease the sulfidrylation, carbonylation and lipid peroxidation, and suppressed pro-apoptotic by reducing the expression of Bax and the activation of pro-caspase 3 to parameters equal to the control ($93,54 \pm 3,15$ e $100 \pm 2,37$, respectively). Thus, the pharmacological findings of d-limonene converge to decrease the pro-apoptotic effect by reducing pro-apoptotic enzymes, reducing the infarct area, and producing ROS and increasing SOD activity.

Key-words: acute myocardial infarction; reperfusion injury; oxidative stress; d-limonene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Representação do potencial de ação rápido cardíaco e suas principais correntes iônicas.....	19
Figura 02. Sinalização intracelular de cálcio no cardiomiócito.....	21
Figura 03. Eletrocardiograma normal.....	25
Figura 04. Estrutura química do d-limoneno.....	31
Figura 05. Formatação dos grupos utilizados no estudo.....	36
Figura 06. Fluxograma de experimentação e variáveis mensuradas.....	41
Figura 07. d-limoneno impede alterações no perfil eletrocardiográfico e elevação do segmento ST induzidas por lesão de IM.....	44
Figura 08. d-limoneno promove cardioproteção reduzindo a área do infarto e prevenindo alterações histológicas do miocárdio induzido por lesão de IM.....	47
Figura 09. Alterações histológicas do miocárdio induzido por lesão de IM.....	47
Figura 10. Dano causado pelo estresse oxidativo é reduzido pelo d-limoneno.....	50
Figura 11. D-limoneno reduz o dano do estresse oxidativo por restaurar a atividade da SOD na lesão cardíaca induzida por IM.....	53
Figura 12. Atividade do fator antioxidante redutor férrico (FRAP).....	54
Figura 13. D-limoneno suprime via pró-apoptótica cardíaca induzida por lesão de IM.....	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP -	Difosfato de adenosina
AEC –	Acoplamento excitação-contração
AMPC –	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP –	Trifosfato de adenosina
ATPase Na ⁺ /K ⁺ -	bomba de sódio potássio
AV –	Atrioventricular
BAV –	Bloqueio atrioventricular
BPM –	Batimentos por minuto
CAT -	catalase
DAC -	Doença Arterial Coronariana
DHE -	dihidroetidio
DI, DII, DIII -	Derivações bipolares 1, 2, 3
DMSO -	<i>dimethyl sulfoxide</i> /dimetil sulfóxido
DNA -	ácido desoxirribonucleico
DNPH -	2,4-dinitrofenilhidrazina
DTNB -	ácido 5,5'-ditiobis2--nitrobenzóico
DTT -	ditiotreitól
ECG –	Eletrocardiograma
E _m -	potencial da membrana
EPM -	Erro Padrão Médio
ER -	Espécie Reativa
EROS -	Espécies Reativas de Oxigênio
FC -	Frequência Cardíaca
FRAP -	Atividade do Fator Antioxidante Redutor Férrico
GPx -	glutathione peroxidase
GR -	glutathione reductase
GSSG -	glutathione oxidada
H&E -	hematoxilina e eosina
i.p. -	intraperitoneal
IM -	Infarto do Miocárdio
I _{Ca,L} –	corrente de cálcio tipo-L

I_K, I_{K_r}, I_{K_s} -	corrente de potássio retificadora retardada rápida e lenta
I_{K1} -	corrente de potássio retificadora de entrada
I_{NA} -	corrente de sódio dependente de voltagem
IR -	Isquemia Reperusão
I_{to} -	corrente de potássio <i>transient outward</i>
MDA -	malondialdeído
NADH -	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH -	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAV -	Nodo Atrioventricular
NCX -	trocador Na^+/Ca^{2+}
NO -	Óxido Nítrico
NOS -	Óxido Nitro Sintase
NSA -	Nodo Sinoatrial
OMS -	Organização Mundial da Saúde
P, QRS, T -	ondas do eletrocardiograma
PBS -	tampão fosfato-salino/ <i>phosphate buffered saline</i>
PTPM -	Poros de Transição de Permeabilidade Mitocondrial
QRS -	Complexo QRS do eletrocardiograma
QTc -	Intervalo QT corrigido pela frequência cardíaca
RL -	Radical livre
RS -	Retículo Sarcoplasmático
RyR -	receptor da rianodina
SERCA -	ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático
SH -	grupamento sulfidrílico
SOD -	superóxido dismutase
TBA -	ácido tiobarbitúrico
TBS-T -	tris-buffered saline Tween 20
TCA -	ácido tricloroacético
TPTZ -	2,4,6-tripiridil-s-triazina
TTC -	2,3,5-tetracloreto de trifeníl-tetrazólio
VE -	Ventrículo Esquerdo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Acoplamento excitação-contração e traçado eletrocardiográfico	12
2.1.1. Atividade elétrica cardíaca e acoplamento elétrico mecânico.....	12
2.1.2. Traçado eletrocardiográfico e Infarto Agudo do Miocárdio	16
2.2. Estresse oxidativo	20
2.3. Infarto do miocárdio.....	23
2.3.1. Infarto do miocárdio induzido por isoproterenol	27
2.4. Terpenos	30
2.4.1. D-Limoneno	31
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. Objetivo Geral	34
3.2. Objetivos Específicos	34
4. METODOLOGIA	35
4.1. Animais	35
4.2. Substâncias e sais	35
4.3. Isquemia induzida por isoproterenol e tratamento com D-limoneno	35
4.4. Aquisição do perfil eletrocardiográfico - ECG.....	36
4.5. Análises da área de infarto.....	37
4.6. Análises histopatológicas	37
4.7. Mensuração do ânion superóxido pelo método de fluorescência com dihidroetídio (DHE)	38
4.8. Determinação da concentração total de proteínas	38
4.9. Mensuração da lipoperoxidação pelo método de TBARs.....	38
4.10. Mensuração da carbonilação e sulfidrilção de proteínas.....	39
4.11. Mensuração das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)	40
4.12. Mensuração do potencial antioxidante do D-limoneno.....	41
4.13. Expressão de proteínas Bax/Bcl2 e pró-caspase 3.....	41
4.14. Análise estatística	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. D-limoneno impede alterações no perfil eletrocardiográfico e elevação do segmento ST induzidas por lesão de IM	43
5.2. D-limoneno promove cardioproteção reduzindo a área do infarto e prevenindo alterações histológicas do miocárdio induzido por lesão de IM	46
5.3. Dano causado pelo estresse oxidativo é reduzido pelo D-limoneno	49

5.4. D-limoneno reduz o dano do estresse oxidativo por restaurar a atividade da SOD na lesão cardíaca induzida por IM	54
5.5. D-limoneno suprime via pró-apoptótica cardíaca induzida por lesão de IM .	56
6. CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS.....	62

1. INTRODUÇÃO

A doença arterial coronariana (DAC), caracterizada pela obstrução das artérias coronárias por placas de ateroma, é a principal causa de morte e incapacidade mundial (CERVANTES GRACIA; LLANAS-CORNEJO; HUSI, 2017). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), atribui-se a DCC 17,9 milhões de mortes anualmente - 31% de todas as causas de mortes no mundo (WHO | World Heart Day) (WONG et al., 2019)

O infarto do miocárdio (IM), lesão miocárdica detectada em exames (eletrocardiográfico e laboratorial) junto com necrose e clínica compatível com isquemia do miocárdio (IBANEZ et al., 2018a), é a primeira manifestação da DAC, representando impactos econômicos decorrentes de sua morbimortalidade. No ano de 2018, no Brasil, 118.746 das internações hospitalares foram atribuídas a esta causa, com a seguinte distribuição regional: 5.307 Norte, 22.869 Nordeste (1.071 atribuídas ao estado de Sergipe), 9.206 Centro-oeste, 58.764 Sudeste, 22.600 Sul. O IM foi responsável, neste mesmo, ano por 12.394 óbitos e representou um gasto de R\$ 458.810.284,76 (DATASUS, 2017).

Em pacientes com IM com elevação do segmento ST (indicativa de lesão miocárdica), a intervenção terapêutica mais efetiva para reduzir a lesão isquêmica aguda do miocárdio é a limitação do tamanho do infarto e a promoção da reperfusão miocárdica oportuna e efetiva, usando terapia trombolítica ou intervenção coronária percutânea primária, como apontado por *guidelines* brasileiros, europeus e norte americanos (PIEGAS et al., 2015; IBANEZ et al., 2018b; THYGESEN KRISTIAN et al., 2018).

Todavia, a despeito da abordagem sistematizada, o processo de reperfusão miocárdica pode induzir a morte adicional de cardiomiócitos, um fenômeno conhecido como lesão de reperfusão miocárdica (HAUSENLOY; YELLON, 2013).

A lesão por isquemia reperfusão (IR) é o dano tecidual adicional à isquemia, causado quando o fornecimento de sangue retorna ao tecido após um período isquêmico (hipóxia). A ausência de oxigênio e nutrientes durante o período isquêmico cria uma condição em que a restauração da circulação resulta em aumento exponencial do processo inflamatório e da indução de estresse oxidativo (TURER; HILL, 2010; HAUSENLOY; YELLON, 2013).

A capacidade de prever e tratar estes distúrbios continua a ser um grande desafio científico e médico. Muitos estudos direcionaram seus esforços para os possíveis tratamentos auxiliares na terapia tecidual (reperusão). Estudos clínicos tentaram reproduzir alguns achados laboratoriais. Pesquisas com animais demonstraram que a superóxido dismutase (SOD) diminuiu a área de infarto na lesão IR, mas clinicamente em humanos não houve efeito cardioprotetor na suplementação de SOD no referido cenário, logo, as abordagens não se mostraram tão eficientes (PASUPATHY SIVABASKARI et al., 2017; SINNING; WESTERMANN; CLEMMENSEN, 2017). Assim, apesar do avanço tecnológico no que se refere a intervenção coronária percutânea e da abordagem de tratamento, a terapêutica aplicada até o momento não atenua os já conhecidos danos gerados pela IR e os custos com o tratamento não devem ser desconsiderados, o que torna os estudos de substâncias com potencialidade terapêutica necessários.

Nesse contexto, outros estudos têm demonstrado a potencialidade terapêutica de substâncias naturais em doenças cardíacas (SANTOS et al., 2011; ALVES-SILVA et al., 2016; BRITTO et al., 2018) e também sobre efeitos da lesão IR, como o estresse oxidativo e arritmias cardíacas (BURCU et al., 2016; BRITTO et al., 2018). Tais substâncias fazem parte do grupo dos terpenos, fitoquímicos presentes em óleos essenciais de plantas, e vêm ganhando espaço no tratamento de diversas doenças, incluindo as do sistema cardiovascular. Dentre esses há o d-limoneno, monoterpene encontrado especialmente em cascas de frutas cítricas, com potencialidade terapêutica antioxidante (ROBERTO et al., 2010), anti-hipertensiva (WANG; LI; SHEN, 2018), analgésica e anti-inflamatória (BACANLI et al., 2017), sendo também passível de exploração a nível nacional e regional. Todavia, ainda não há estudos que demonstrem os efeitos do d-limoneno no infarto do músculo cardíaco. Assim, o presente estudo propõe-se a analisar os efeitos cardioprotetores do d-limoneno frente ao IM, o que pode ser de grande valia no tratamento de patologias cardíacas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Acoplamento excitação-contração e traçado eletrocardiográfico*

2.1.1. *Atividade elétrica cardíaca e acoplamento elétrico mecânico*

A atividade elétrica é originada no nodo sinusal (NSA) se propagando primeiro pelo átrio direito e espalhando-se então para ambos os átrios, atingindo então, próximo ao seio coronariano, o nodo atrioventricular (NAV). Ao potencial de ação (PA) gerado nos nodos, cuja propagação é mais lenta, dá-se o nome de PA lento. Por tais atribuições, o NSA é considerado o “marca-passo” cardíaco, ditando a frequência cardíaca (KIANI et al., 2013).

A partir do NAV, a atividade elétrica passa ao feixe de His e fibras de Purkinje e após aos ventrículos, atingindo toda a musculatura ventricular, iniciando-se na face endocárdica (devido ao contato com as fibras de Purkinje), seguindo pelas demais áreas dos ventrículos e septo interventricular, na metade inferior, e então rumo ao epicárdio e parte restante do septo (KIANI et al., 2013).

O PA rápido é característico das regiões atrial, ventricular, feixe de His e fibras de Purkinje, e goza de diferentes fases com a participação de íons específicos em cada uma delas, como exemplificado na figura 1. Segue-se breve explanação (TRENOR et al., 2017; PORTER et al., 2018):

- Fase 0: rápida despolarização. A corrente despolarizante de maior relevância nesta fase é a de sódio dependente de voltagem (I_{Na}), sendo essencial para que o PA seja rapidamente disseminado. Tal canal tem por característica rápidas ativação e inativação, sendo que a inativação ocorre na fase 1, concomitantemente com a abertura do corrente de potássio *transient outward* ($I_{to,1}$), promovendo rápida, porém incompleta, repolarização.
- Fase 1: repolarização rápida. Esta fase promove uma repolarização incompleta e relaciona-se principalmente a corrente de potássio *transient outward* ($I_{to,1}$), a sua abertura. A ativação e inativação do I_{to} ocorre de maneira rápida (porém a inativação de forma não completa).
- Fase 2: platô. Nesta fase as condutâncias das correntes de despolarização, dentre as quais a corrente para cálcio tipo L ($I_{Ca,L}$), e de repolarização praticamente se igualam, e durante esse processo corrente retificadora IK_1 está diminuída, o que leva a um potencial de membrana praticamente estável.

- Fase 3: repolarização. Nesta fase, as correntes de efluxo imperam - corrente de potássio retificadora retardada rápida e lenta (I_{kr} , I_{ks}), significando um aumento na G_K (condutância de potássio) e promovendo a repolarização de maneira rápida devido ao grande efluxo desse íon.
- Fase 4: repouso. A principal corrente nesta fase é a I_{K1} – corrente de potássio retificadora de entrada. Também há a contribuição da ATPase de Na^+/K^+ - a operacionalização normal contribui com a manutenção do potencial de repouso, uma vez que coloca 3 íons Na^+ para fora e 2 íons K^+ para dentro da célula, contribuindo com a manutenção do K^+ intracelular. Nessa fase as correntes despolarizantes são praticamente nulas.

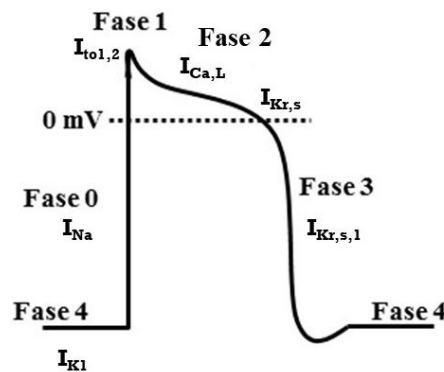


Figura 01. Representação do potencial de ação rápido cardíaco e suas principais correntes iônicas. Fase 0 - despolarização; fase 1 - repolarização rápida; fase 2 - platô; fase 3 - repolarização; fase 4 - repouso. Corrente de sódio (I_{Na}); Corrente transiente de efluxo ($I_{to1,2}$); Corrente de cálcio pelos canais do tipo-L ($I_{Ca,L}$); Corrente de potássio retificador retardado rápido (I_{kr}) e lento (I_{ks}); Corrente transiente de influxo (I_{K1}). Fonte: Elaborada pelo autor.

Também importante para a propagação da atividade elétrica, as junções comunicantes (*gap junctions*) são estruturas especializadas encontradas na membrana que permitem a transferência de substâncias entre células próximas. Em condições fisiológicas normais, as junções comunicantes estão abertas, o que permite a livre passagem de ânions, cátions e demais moléculas (respeitado o limite de até 1.000 daltons), o que significa que inclusive os íons que participam na propagação da atividade elétrica podem transitar entre as células através desses canais. Assim, quando há o PA numa dada região miocárdica, este estende-se por todo o músculo cardíaco, oportunizando os sincícios atrial e ventricular. As mitocôndrias presentes

nas células musculares estriadas cardíacas, conectadas pelas junções comunicantes, são responsáveis pelo fornecimento de energia que a contração demanda (LESNEFSKY et al., 2017).

Um papel importante da atividade elétrica cardíaca é induzir ao processo contrátil de forma que tal sistema é denominado acoplamento excitação-contração, sendo o cálcio o promotor de tal processo.

Após a despolarização, há a abertura dos canais para Ca_L e Ca_T (fase 2 do PA rápido), permitindo a entrada de Ca^{2+} na célula. Porém o Ca^{2+} que entra no citoplasma oriundo do líquido extracelular não é suficiente para gerar uma contração das miofibrilas, ao invés, funciona como um gatilho para liberar o Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS).

O Ca^{2+} então presente no citoplasma se liga a um canal liberador de Ca^{2+} , presente na membrana do RS, chamado receptor de rianodina – RyR, sendo a isoforma RyR2 expressa principalmente no músculo cardíaco. Tal ligação ativa o canal, liberando então o Ca^{2+} presente no interior do RS. O Ca^{2+} se liga a troponina C. O complexo Ca^{2+} /troponina interage com a tropomiosina, expondo os locais ativos na molécula de actina, oportunizando sua ligação à miosina. Nesse ponto tem-se o início da contração muscular, já que troponina e tropomiosina, actina e miosina são proteínas (moduladoras da contração e contráteis) presentes nos filamentos do sarcômero, unidade contrátil do músculo, que participam do processo de contração. A ligação da miosina com os sítios ativos de actina causa alteração conformacional utilizando energia derivada da fosforilação do ATP pela enzima ATPase, convertendo-o em difosfato de adenosina (ADP), ativando assim o movimento de contração através do encurtamento do sarcômero. O ATP é obtido em especial por mecanismos aeróbicos pelas mitocôndrias via ciclo de Krebs (BERS, 2002; EISNER et al., 2017).

Um esquema sobre a sinalização intracelular do cálcio no cardiomiócito pode ser observado abaixo, na figura 2.

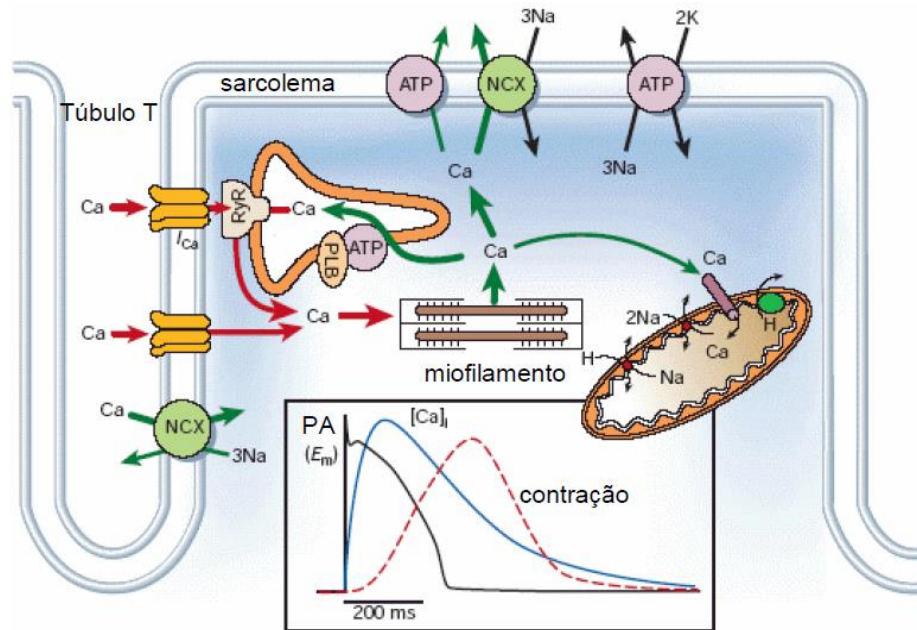


Figura 02. Sinalização intracelular de cálcio no cardiomiócito. Relação curso temporal do potencial de ação; transiente de cálcio até a contração do cardiomiócito. NCX: trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; RyR: receptor da rianodina; PLB: fosfolambam; E_m : potencial da membrana (adaptado de Bers, 2002).

Após cessar a entrada de Ca^{2+} pelos canais, ocorre a diminuição intracelular desse íon principalmente pela ação da ATPase de cálcio do RS [sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase - SERCA2a]. Existem outros mecanismos - ativação da Ca^{2+} -ATPase do sarcolema (plasma-membrane Ca^{2+} -ATPases - PMCA), trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) e recaptação do Ca^{2+} para mitocôndria. Todavia, atribui-se a atividade da SERCA2a aproximadamente 92 % da recaptação do Ca^{2+} em cardiomiócitos de ratos. A atividade da SERCA2a é inibida pela proteína fosfolambam, que quando fosforilada, deixa de inibir a SERCA2a, acelerando a recaptação de Ca^{2+} pela mesma (SERCA2a). Por sua vez, a fosfolambam pode ser fosforilada por proteínas quinases (PKA, PKC ou proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina - CaMK II) (BERS, 2002; EISNER et al., 2017).

Assim, após a diminuição do Ca^{2+} citoplasmático, o mesmo se desliga da troponina C e há inativação dos locais ativos da actina com a miosina. O ADP é então substituído por outro ATP na cabeça da miosina, até que um novo evento ocorra (BERS, 2002).

Pelo exposto compreende-se que o PA é a centelha que deflagra a contração cardíaca e que, para tal, o Ca^{2+} desempenha importante papel no acoplamento excitação-contração.

2.1.2. Traçado eletrocardiográfico e Infarto Agudo do Miocárdio

Para avaliar a geração e a propagação da atividade elétrica cardíaca utiliza-se o eletrocardiograma (ECG). As fibras do músculo cardíaco em repouso têm diferentes potenciais nos meios extra e intracelular, sendo o meio intracelular sempre negativo. A diferença de potencial entre dois pontos do meio extra, em repouso, é nula (o meio extracelular tem baixa resistência). Quando as fibras cardíacas de um dado local despolarizam, o valor do potencial elétrico do meio extra próximo à região ativa é reduzido, ficando mais negativo que o potencial elétrico encontrado no meio intracelular, originando agora uma diferença entre dois pontos do meio extra e, uma vez que o meio extra é um condutor de baixa resistência, há deslocamento de carga elétrica, originando corrente elétrica entre as células despolarizadas e as que ainda estão em repouso (PASTORE et al., 2016).

A corrente gerada, quando é intensa ao ponto de vencer a resistência das demais células, propaga a despolarização dos locais ativos em direção aos locais inativos e, quando todas as células estão despolarizadas, a diferença entre dois pontos (fluxo de corrente) é novamente nula. Em seguida há a repolarização, que também se propaga. A esta última situação denomina-se corrente repolarizante, e à primeira, corrente despolarizante. O campo elétrico originado no deslocamento de ambas as correntes se espalha por todo o organismo, assim, quando posicionados eletrodos no corpo é possível realizar o registro das variações do potencial elétrico, o que é denominado traçado eletrocardiográfico (ALGHATRIF; LINDSAY, 2012; PASTORE et al., 2016; SUBRAMANIAN, 2017).

Com base na equivalência temporal entre os registros dos potenciais nos diferentes locais do coração e as ondas do ECG (figura 3) e sabendo-se que o ciclo cardíaco é iniciado com a despolarização do NSA e consequente despolarização atrial, tem-se (ALGHATRIF; LINDSAY, 2012):

- Onda P: o primeiro local a gerar PA é o NSA, localizado entre as veias cavas no átrio direito. *A priori*, a atividade elétrica propaga-se no átrio direito e depois passa ao átrio esquerdo. A despolarização de ambos os átrios origina a onda

P. Assim, a duração dessa onda se refere ao tempo necessário para que a corrente de despolarização seja propagada pelos dois átrios (80-100 ms). Todavia, pode haver variabilidade na ativação atrial (na direção da onda de excitação) decorrente da quantidade de atividade autonômica local e alteração da frequência cardíaca, com consequente alteração no padrão de registro da onda P. Para passar para os ventrículos, em situações normais, a condução elétrica passa pelo NAV – pois o tecido que separa os átrios dos ventrículos constitui-se numa barreira para a condução elétrica. Similar ao NSA, a condução no NAV é lenta e, sendo uma área pequena, o campo elétrico gerado não é suficientemente grande para que seja captado na superfície corporal. No traçado do ECG pode-se identificar a passagem elétrica pelo NAV no início do segmento PR. Embora essa passagem elétrica não gere “onda” no ECG, a estimulação elétrica segue avançando.

- Complexo QRS: a ativação das fibras do miocárdio ventricular deve-se aos feixes do sistema His-Purkinje. A conformação morfológica das fibras de Purkinje (maior diâmetro e alto índice de acoplamento intercelular) e a despolarização decorrente de grande entrada de Na^+ permitem que o potencial se propague rapidamente. A sequência de ativação dos ventrículos, pela região em comum do feixe de His, passa pelo septo em direção ao ápice, atingindo as paredes ventriculares quase que simultaneamente. A duração da ativação ventricular pode ser medida pela duração do complexo QRS e o formato apiculado das ondas decorre da velocidade com que os ventrículos são estimulados. Por todo o exposto também pode-se depreender que a ativação das paredes dos ventrículos acontece a partir do endocárdio em direção ao epicárdio.
- Onda T: quando os ventrículos estão totalmente despolarizados, não há diferença de potencial (sem fluxo de corrente), o que nos leva à linha isoeletrica do segmento ST. Em seguida, há um fluxo de corrente de repolarização – representada pela onda T. O sentido na representação gráfica da onda T é positivo em condições normais. A onda T é uma onda de repolarização.

Faz-se necessário também breve explanação acerca dos intervalos e segmentos evidenciados no traçado eletrocardiográfico (PASTORE et al., 2016).

- Intervalo QT: representa a duração da despolarização e repolarização ventricular. Um fator importante a observar é que este intervalo sofre influência

da frequência cardíaca, portanto, esta interfere na duração do intervalo QT. Em decorrência disso, tal intervalo é expresso de forma “corrigida”, sendo representado pelo QTc (QT corrigido) através da fórmula de Bazett:

$$QTc = \frac{QT}{\sqrt{RR}}$$

- Intervalo PR: identificado ao início da onda P até o começo do complexo QRS, representando a ativação elétrica do NSA até o início da ativação elétrica do feixe de His e fibras de Purkinje.
- Segmento PR: identificado pelo final da onda P até o começo do complexo QRS, representando a propagação da atividade elétrica através do NAV e feixe de His e fibras de Purkinje.
- Segmento ST: começa ao final no complexo QRS e termina ao começo da onda T, representando o tempo entre a despolarização e repolarização dos ventrículos.

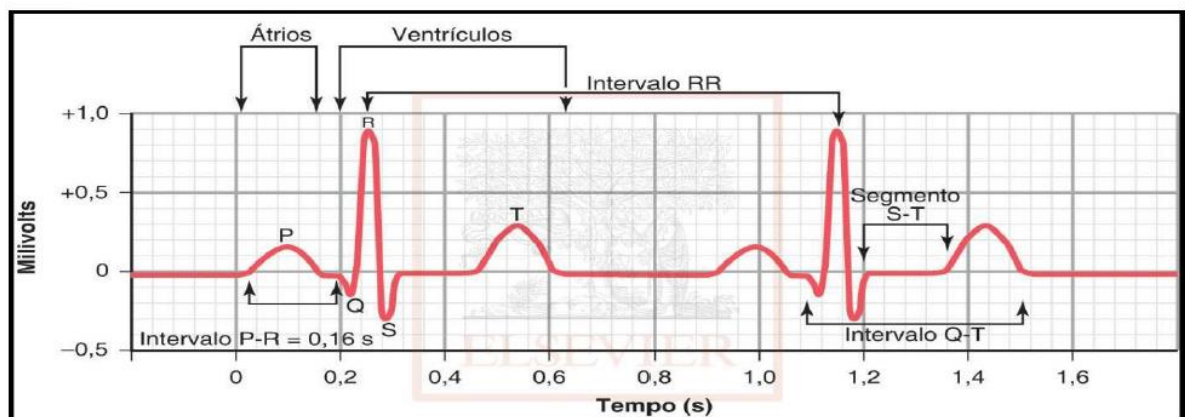


Figura 03. Eletrocardiograma normal. Ondas P, Q, R, S, T. Intervalos RR, QT, PR e segmento ST (Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology - 13th Edition).

O eletrocardiograma é a representação gráfica das variações da voltagem em função do tempo, seguindo a sequência de ativação elétrica do coração, conforme já descrito (SUBRAMANIAN, 2017). Esse registro é realizado a partir de diferentes ângulos para a obtenção de uma visão tridimensional. Aos eixos elétricos que unem os eletrodos utilizados para a captação dos sinais elétricos cardíacos, localizados nos membros, dá-se o nome de derivações bipolares (PASTORE et al., 2016).

As derivações bipolares (DI, DII e DIII) foram definidas por Einthoven, sendo atribuída às mesmas a Lei de Einthoven, que determina que, se houver ciência do

valor do potencial elétrico entre duas derivações, o valor da terceira poderá ser estabelecido por cálculo matemático. Assim, a disposição dos eletrodos dá-se conforme a referida lei, sendo (ALGHATRIF; LINDSAY, 2012):

- Derivação 1: a porção negativa do amplificador é localizada no braço direito e a porção positiva, no braço esquerdo.
- Derivação 2: a porção negativa do amplificador é localizada no braço direito e a porção positiva, na perna esquerda.
- Derivação 3: a porção negativa do amplificador é localizada no braço esquerdo e a porção positiva, na perna esquerda.

No contexto de IM, a atividade elétrica cardíaca deve ser avaliada junto ao contexto da clínica, exames laboratoriais e anamnese, todavia, pode-se afirmar que a avaliação do ECG está presente desde a fase diagnóstica, sendo instrumento importante para monitorização e direcionamento de condutas (BRADY; MORRIS, 2000; PIEGAS et al., 2015)

Após o estabelecimento da oclusão da artéria coronária, o ECG sofre alterações de evolução temporal. Um dos primeiros achados, podendo ser evidenciado minutos após o fluxo sanguíneo interrompido, diz respeito a onda T apiculada e, paralelamente, alargada. Tais alterações evoluem para a elevação do segmento ST - inicialmente com um achatamento (perda de ângulo) e após o supradesnívelamento. As anormalidades do segmento ST podem ser demonstradas desde pequenas elevações até elevações mais proeminentes. Em situações onde o aumento do segmento ST é muito elevado, pode-se observar também uma “junção” do complexo QRS à onda T (BRADY; MORRIS, 2000).

Outras alterações morfológicas no traçado de ECG aparecem mais tardiamente, como a aparição de ondas Q em deflexão negativa - caso o eletrodo de registro esteja sobre a lesão miocárdica; e até mesmo o desaparecimento da onda Q no caso de desenvolvimento de tecido cicatricial da área em questão, tornando-a eletricamente inativa - tais alterações desaparecem após 24 h. Durante a evolução do processo, pode ser também observado a inversão da onda T, sendo tal linversão característica de infarto da região epicárdica (BRADY; MORRIS, 2000).

Logo, como observado, as alterações eletrocardiográficas decorrentes do IM estão relacionados ao curso-temporal da patologia, como também especificidades topográficas; todavia, pode-se afirmar que as manifestações de isquemia miocárdica que se apresentam mais precocemente são as alterações do segmento ST e da onda

T. Ainda, o deslocamento do segmento ST está relacionado a uma maior área de isquemia, e consequentemente, com um pior prognóstico (THYGESEN et al., 2012).

2.2. Estresse oxidativo

O radical livre (RL) é identificado quimicamente como uma estrutura que tem um elétron desemparelhado no orbital molecular externo. Essa característica confere reatividade à molécula e a deixa instável, pronta a se ligar com quaisquer outras estruturas. Os RL originam-se de reações de oxirredução (agentes oxirredutores) - ou cedem o elétron desemparelhado (oxidam-se) ou recebem um elétron (reduzem-se) (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Muitas vezes o termo é utilizado para elementos reativos que não possuem o elétron desemparelhado, por conseguinte, o termo mais acertado é espécie reativa – ER. No caso do oxigênio, o mesmo pode ficar instável durante a transferência de elétrons, originando assim espécies reativas de oxigênio – EROs (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004).

A geração de ER ocorre a nível celular: nas mitocôndrias, citoplasma e membranas. Íons cobre e ferro atuam como catalisadores na geração de ER, como mostrado pela reação de Fenton, que gera o radical hidroxila (OH^\bullet) através da reação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com cobre/ferro (BIRBEN et al., 2012; LUSHCHAK, 2014).

A fonte de ER no miocárdio é a cadeia de transporte de elétron mitocondrial (NADPH oxidase) e NOS (óxido nítrico sintase). Através da cadeia transportadora de elétron, a mitocôndria metaboliza a maior parte do oxigênio – mas não todo ele, de maneira tetravalente (aceita 4 elétrons), gerando água (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial gera adenosina trifosfato (ATP) através dos complexos enzimáticos de citocromos - o citocromo oxidase controla a geração de ER na mitocôndria, mas uma porcentagem do O_2 não é metabolizado nesta via, sendo desviado e reduzido de forma univalente, originando as ERO: ânion superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$ (ERO mais comum), OH^\bullet , H_2O_2 . O $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 participam na reação que gera OH^\bullet , sendo OH^\bullet a ERO mais reativa de todas devido ao potencial de desestruturar (causar danos a lipídios, proteínas e ácido nucleico) qualquer célula que esteja próxima a ela (BIRBEN et al., 2012; MORIS et al., 2017).

A geração de ERO de maneira controlada pelo organismo é necessária, pois as ER participam de vários processos importantes no organismo como sinalização celular, contração muscular, fecundação do óvulo, atuação no sistema de defesa,

produção de ATP dentre outros (LUSHCHAK, 2014). Assim, tendo em vista que a produção das ERO é contínua, faz-se necessário um sistema de defesa antioxidante para manter as ERO no limiar fisiológico, para que não haja danos celulares.

O sistema de defesa antioxidante é dividido em enzimático e não enzimático, sendo assim representado (BIRBEN et al., 2012):

- Enzimático: superóxido dismutase – SOD, catalase – CAT, glutathione peroxidase – GPx, e glutathione reductase – GR.
- Não enzimático: em sua maioria são de fontes exógenas. Vitaminas, minerais e compostos fenólicos que compõem esse grupo. Vitaminas como a vitamina A (retinol), o ácido ascórbico (vitamina C) e vitamina E podem atuar, por exemplo, protegendo a membrana celular à medida que eliminam os oxidantes produzidos na lipoperoxidação e inativando a ERO. Todavia, alguns componentes desse sistema, em doses elevadas, podem atuar como pró-oxidantes. A glutathione também faz parte desse grupo.

O sistema de defesa enzimático atua como abaixo discriminado (AKSENOV; MARKESBERY, 2001; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BIRBEN et al., 2012):

- SOD: dismuta o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , que é menos reativo e é degradado por outras enzimas. Todavia, o H_2O_2 quando não é eliminado do organismo participa da reação que produz o OH^{\bullet} . Existem 4 tipos de SOD, diferentes na estrutura bioquímica e molecular: Sod1 ou SodCuZn, Sod2 ou SodMn, Sod3 ou ECSod e SodFe.
- CAT: a função principal é catalisar a reação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. Para tal, é necessário a presença da NADPH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida) para ativar a enzima, estando cada subunidade da CAT fortemente ligada a uma molécula de NADPH (KIRKMAN et al., 1999).
- GPx: utilizam vários redutores celulares para inativação dos peróxidos. A ação da GPx é baseada na oxidação da GSH (glutathione reduzida), oxidando-a em glutathione oxidada (GSSG) e após essa reação, a glutathione pode voltar ao estado de reduzida através da ação da glutathione reductase (GR), podendo então ser iniciado um novo ciclo.

Assim, CAT e GPx atuam para impedir que o H_2O_2 se acumule – logo, evita a geração de OH^{\bullet} , ERO para qual não há sistema de defesa.

O sistema de defesa antioxidante pode atuar em diferentes linhas: prevenindo que a ERO se forme, bloqueando a ação das EROs ou restaurando as células lesionadas. Dessa forma, sob condições fisiológicas, o organismo consegue manter o controle na relação entre geração de agentes oxidantes e atuação do sistema antioxidante. Todavia, uma falha entre esses agentes, seja por maior geração dos primeiros ou por morosidade na ação dos segundos, gera o estresse oxidativo. As EROs modificam a membrana e as organelas celulares como o retículo sarcoplasmático, a mitocôndria e o núcleo - envolvidas na regulação do Ca^{2+} no cardiomiócito (SINNING; WESTERMANN; CLEMMENSEN, 2017). Além disso, a oxidação das moléculas em decorrência desse estresse está na gênese de muitas doenças, por exemplo, a lesão causada ao DNA pode deflagrar um processo oncológico; o dano à membrana plasmática pela peroxidação lipídica libera malondialdeído (MDA), que danifica RNA, DNA e proteínas, a oxidação de proteínas libera citocromo C e desencadeia a apoptose; além do rompimento da membrana levando-a à morte (DHALLA; TEMSAH; NETTICADAN, 2000). Ainda, o estresse oxidativo já está associado à gênese de problemas cardiovasculares, assim como o IM. A atividade do endotélio é alterada pelo estresse oxidativo através da depleção de óxido nítrico (NO) pelo peroxinitrito (ONOO^-), produzido por NO e $\text{O}_2^{\bullet-}$. (CERVANTES GRACIA; LLANAS-CORNEJO; HUSI, 2017).

Nos processos intracelulares as EROs, como dito anteriormente, afetam a estrutura e função celular, como em proteínas, levando a disfunções enzimáticas e em lipídios, causando peroxidação e levando a célula à instabilidade. Na lesão IR, o estresse oxidativo altera o transporte do Ca^{+2} por prejudicar as organelas envolvidas neste processo e promove fibrose miocárdica, como também a apoptose e falha cardíaca num contexto de isquemia (HAUSENLOY; YELLON, 2013). No que se refere a apoptose, a IM induz genes pró-apoptóticos como caspases 3, 8, 9 e bax e sua ativação, e devido a alteração na permeabilidade da membrana que já foi causada, têm-se permitida a entrada desses elementos na célula, inclusive do citocromo C (SINNING; WESTERMANN; CLEMMENSEN, 2017).

No que se refere ao controle das EROs na lesão IM, ainda não há recursos efetivos (intervenção farmacológica) para tal manejo. Assim, a utilização de produtos naturais com atividade antioxidante mostra-se uma alternativa elegível, sendo tais produtos bem estudados nesse tocante, uma vez que alguns sabidamente exibem atividade antioxidante, dentre estes, os terpenos (ALVES-SILVA et al., 2016).

2.3. Infarto do miocárdio

A expressão infarto do miocárdio – IM é utilizada quando há lesão miocárdica evidenciada em exame eletrocardiográfico e laboratorial (elevação da troponina cardíaca) junto com necrose e clínica compatível com isquemia do miocárdio - como por exemplo dores em maxilar, pescoço, membro superior esquerdo, além de dificuldade para respirar, náusea/vômito, palpitação dentre outros (IBANEZ et al., 2018b).

A tratativa para a injúria miocárdica causada é padronizada, sendo, além de uma rápida revascularização do músculo cardíaco, a administração de fármacos tais como morfina, nitrato, ácido acetilsalicílico e oxigênio, e a depender das condições hemodinâmicas, betabloqueadores e inibidores da enzima conversora da angiotensina. De maneira geral, a abordagem feita no tratamento do IM utiliza (ANDERSON; MORROW, 2017):

- Analgesia e sedação: para diminuir a intensidade da dor, pois esta gera ansiedade e amplifica a resposta autonômica (consequente ao aumento da atividade simpática), o que reduz o limiar para o desencadeamento de taquiarritmias ventriculares e aumenta o consumo miocárdico de oxigênio.
- Oxigenoterapia: a ventilação superficial gerada pela ansiedade na fase aguda do IM torna importante a administração de oxigênio suplementar. Quando isso é postergado além das 3 primeiras horas, há vasoconstrição periférica o que pode aumentar os efeitos deletérios, além de aumentar os custos do tratamento e piorar o prognóstico em pacientes com comorbidades, a exemplo de gerar narcose em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).
- Nitratos: por serem medicamentos que promovem vasodilatação arterial e principalmente, venosa, os nitratos diminuem a pré e a pós-carga ventricular, consequentemente, diminuindo o trabalho cardíaco e o consumo de oxigênio. Não é recomendado sua utilização de maneira rotineira, uma vez que não diminuem a mortalidade e sim a morbidade, sendo utilizados, portanto, visando o alívio da dor isquêmica, da congestão pulmonar e a diminuição pressórica.
- Terapia antiagregante: quando há a ruptura da placa aterosclerótica, os componentes trombogênicos são expostos e isso facilita a ativação e, consequentemente, a formação de um trombo rico em plaquetas. Este trombo é mais resistente à lise causada pelos fibrinolíticos do que os trombos de

hemácias e fibrina. Portanto, a utilização dos antiplaquetários é fundamental para a dissolução do trombo, gerando grande benefício adicional sobre a mortalidade em pacientes submetidos ou não a trombólise. Desse modo, deve ser administrado a todos os pacientes com IM, salvo em pacientes alérgicos à medicação.

- Jejum: trata-se de um cuidado adicional observado em todo momento na presença da dor, visando um adequado preparo para a realização de exames, como também a redução do risco de aspiração pelos vômitos.

Como observado, a maior parte da abordagem visa o restabelecimento do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, da oxigenação, uma vez que num cenário de isquemia superior a 20 minutos há morte de cardiomiócitos (HAUSENLOY; YELLON, 2013).

Durante o período de isquemia miocárdica a privação de oxigênio e nutrientes desencadeia alterações metabólicas e bioquímicas, tais alterações levam à despolarização da membrana mitocondrial e depleção de ATP, uma vez que na falta de oxigênio o metabolismo celular deixa de ser aeróbio e começa a funcionar pelo sistema anaeróbio, com produção de lactato e diminuição do potencial de hidrogênio (pH – sendo o fisiológico intracelular 7.2), acidificando o meio. Conseqüentemente, o trocador sódio/hidrogênio (Na^+/H^+) é ativado direcionando H^+ para o meio extra e Na^+ para o meio intracelular, a fim de reduzir o H^+ intracelular para reestabelecer o pH. Tal sobrecarga de Na^+ ativa o trocador sódio/cálcio (que coloca 3Na^+ para dentro e 1Ca^{2+} para fora na função normal) - contudo, na função reversa (3Na^+ para fora e 1Ca^{2+} para dentro), retirando Na^+ do meio intra e colocando Ca^{2+} em seu lugar (HAUSENLOY; YELLON, 2013).

A isquemia também “inativa” a bomba sódio/potássio (Na^+/K^+), o que aumenta ainda mais a concentração de Na^+ no meio intracelular. O meio ácido promove diminuição da voltagem da membrana, aumentando assim sua resistência e dificultando a condução elétrica. Além disso, o acúmulo de cálcio leva ao desacoplamento das conexinas e ativam enzimas, como as fosfolipases e proteases, logo, o período isquêmico também desencadeia falha na contratilidade cardíaca, pois o acoplamento excitação-contração depende especialmente do transporte do Ca^{2+} (HAUSENLOY; YELLON, 2013). A isquemia também reduz o número dos receptores RyR (rianodina), essenciais para a maquinaria contrátil, como explanado no tópico acoplamento excitação-contração (ZUCCHI R et al., 1994).

Nesse ponto, o dano tecidual que já existe é então agravado pela lesão de reperfusão, à medida que o tecido é reperfundido e as células recebem oxigênio e nutrientes, a respiração celular deixa de trabalhar no modo anaeróbico e entra no modo aeróbico, isso promove reativação da cadeia de transporte de elétrons, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) - paralelamente, a xantina oxidase e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) também geram EROs. As EROs são as principais causadoras do dano na lesão por reperfusão, por induzir a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), funcionando como um atrativo de neutrófilos e ocasionando disfunção no RS e aumento de Ca^{2+} intracelular. Tais acontecimentos causam dano na membrana plasmática por peroxidação lipídica, ocasionando desnaturação enzimática e lesão oxidativa no DNA. O trocador Na^+/H^+ mantém-se ativado, e diferentemente de quando havia privação de oxigênio, diminui o ácido láctico contribuindo com a volta à normalidade do pH. A restauração do potencial da membrana da mitocôndria faz com que haja um deslocamento de Ca^{2+} para o interior da mitocôndria, reforçando a indução da abertura do PTPM (HAUSENLOY; YELLON, 2013; ANDERSON; MORROW, 2017; MORIS et al., 2017).

Tais efeitos são determinados pela lesão por isquemia/reperfusão (IR), que causa injúrias ao miocárdio, levando à indução de arritmias, disfunção contrátil (*myocardial stunning*), obstrução microvascular e injúria letal (morte de cardiomiócitos que ainda eram viáveis após o IM). Abaixo seguem os fatores envolvidos nos efeitos deletérios causados no miocárdio pela IR (HAUSENLOY; YELLON, 2013; ANDERSON; MORROW, 2017):

- Estresse oxidativo: nos primeiros minutos em que a reperfusão do miocárdio acontece o estresse oxidativo está presente, em especial o $\text{O}_2^{\bullet-}$, contribuindo com a injúria letal.
- Sobrecarga de cálcio intracelular: essa sobrecarga é iniciada na isquemia, sendo intensificada na reperfusão devido à rotura da membrana plasmática, lesão no RS causada pelo estresse oxidativo e reenergização da mitocôndria, um processo que oportuniza a recuperação da membrana mitocondrial, deslocando Ca^{2+} para dentro da mitocôndria e induzindo a abertura do PTPM.
- Rápido restabelecimento do pH: o pH diminui em decorrência da isquemia e durante a reperfusão é restabelecido de forma rápida em decorrência da ação do trocador Na^+/H^+ e Na^+/HCO^- simporte. Esta mudança abrupta do pH

contribui com a injúria letal, uma vez que contribui com a abertura do PTPM e contratura diastólica dos cardiomiócitos, haja vista a sobrecarga de Ca^{2+} .

- Poro de transição de permeabilidade mitocondrial: este poro é um canal não seletivo da membrana mitocondrial e sua abertura leva à morte celular através da despolarização da membrana mitocondrial e impedimento da fosforilação oxidativa, levando a diminuição de ATP. O poro permanece fechado durante a isquemia, sendo aberto apenas na reperfusão em decorrência do Ca^{2+} mitocondrial e sobrecarga de fosfato, além do estresse oxidativo, depleção de ATP e rápida restauração do pH, como já citado.

Além dos fatores descritos, faz-se necessário citar o papel da inflamação que, embora ainda não esclarecida sua função na lesão IR - se benéfica ou maléfica, não deixa de ser uma variável neste cenário. Também é importante salientar que nem todos os fatores maléficos são iniciados com a reperfusão, a exemplo da apoptose, que embora não inicie com a reperfusão permanece durante a mesma, contribuindo com a lesão IR (BRITTO et al., 2018).

Como já mencionado, a reperfusão em um miocárdio agudamente isquêmico independentemente da correta abordagem no tratamento, pode levar à morte de cardiomiócitos – o que é atribuído às lesões secundárias causadas pela reperfusão (lesão IR).

O tamanho do infarto do miocárdio é um determinante importante dos desfechos cardíacos em pacientes com IM com elevação do segmento ST. Além disso, na maioria dos casos ocorre morte súbita decorrente de uma taquiarritmia ventricular. Sabe-se que a injúria cardíaca induz arritmias ventriculares por induzir fatores moleculares pró-arritmogênicos, como o estresse oxidativo, a sobrecarga de Ca^{2+} no RS e a abertura do PTPM são os principais fatores desencadeantes das arritmias ventriculares que ocorrem na fase inicial da reperfusão, sendo a extrassístole uma forma branda de arritmia ventricular (LESNEFSKY et al., 2017). Contudo, a taquicardia ventricular (TV) e a fibrilação ventricular (FV) continuam sendo os subtipos mais frequentes e letais de arritmias cardíacas e a causa de morte súbita (O’GARA et al., 2013).

2.3.1. Infarto do miocárdio induzido por isoproterenol

O infarto agudo do miocárdio (IM) é definido como um estado patológico em que ocorre morte celular miocárdica devido a isquemia prolongada. Tal fato promove diminuição do glicogênio celular, relaxamento de miofibrilas e ruptura da membrana plasmática, sendo tais alterações ultraestruturais as primeira encontradas - em 10 a 15 minutos do início da isquemia (VIRMANI; FORMAN; KOLODIE, 1990; ANDERSON; MORROW, 2017). Foram observadas, através de microscopia eletrônica progressiva, anormalidades mitocondriais a partir de 10 minutos após a oclusão coronariana. Experimentalmente foi observado que a necrose celular progride do subendocárdio para o subepicárdio no decorrer do tempo de isquemia, apesar de em humanos a visualização da necrose miocitária só aconteça após algumas horas, em modelos experimentais animais e em células isoladas evidências bioquímicas mostram que a morte celular miocárdica decorrente de apoptose pode ser detectada dentro de 10 minutos da isquemia induzida (OOI; ISOTALO; VEINOT, 2000).

Diversos modelos experimentais de IM são utilizados em célula (*in vitro*) (SHEN et al., 2012), coração isolado (*ex vivo*) (SANTANA et al., 2018) e animal vivo (*in vivo*) (JAIN et al., 2018). Um dos modelos mais utilizados *in vivo* é a indução de IM em ratos pela ligadura da coronária descendente anterior esquerda, contudo este modelo, como todos os outros, apresenta desvantagens tais como: necessidade de toracotomia, suporte ventilatório e analgesia pós-operatória e maior incidência de eventos de morbimortalidade não relacionados ao IM (a exemplo de infecção e pneumotórax) sendo a mortalidade superior a 50% (TURER; HILL, 2010; FRANK et al., 2012).

Considerando os eventos na injúria miocárdica ocorrida no IM em humanos, pode-se afirmar que há similaridade no modelo com isoproterenol (ISO), uma vez que o mesmo atende aos requisitos contidos na Quarta Definição Universal de Infarto do Miocárdio (2018) que determinam o conceito do IM (THYGESEN KRISTIAN et al., 2018), tais como: aumento dos marcadores de lesão miocárdica troponina T e troponina I, alterações histológicas como aumento da contagem de leucócitos e neutrófilos, redução da atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase e catalase, processo inflamatório, degeneração miofibrilar e necrose (BROOKS; CONRAD, 2009; SUCHAL et al., 2016; JAIN et al., 2018; YU et al., 2018).

O ISO é um agonista adrenérgico não seletivo (receptores β_1 e β_2), assim, leva ao aumento dos efeitos cronotrópico, dromotrópico e inotrópico cardíacos (RONA, 1985). O IM promovido pelo ISO ocorre devido ao desequilíbrio entre a estimulação cardíaca e a diminuição do fluxo sanguíneo coronário – resultante do colapso nas coronárias, causando além da isquemia um aumento do gasto energético através da respiração celular gerando aumento de EROs (JAIN et al., 2018).

As lesões miocárdicas induzidas pelo ISO estão relacionadas às suas propriedades estimuladoras cardíacas gerando alterações histológicas, fisiológicas e bioquímicas a longo prazo (0-96h) após a administração do ISO em ratos (CHAGOYA DE SÁNCHEZ et al., 1997).

Durante o IM com ISO, os primeiros eventos são observados após 2 minutos de administração do ISO, um aumento médio de 70% na frequência cardíaca e uma diminuição de 40% e 30% na pressão arterial diastólica e sistólica respectivamente, que perdura de 3 minutos a 6 horas após a administração do ISO, o que induz uma hipóxia funcional que resulta em IM (CHAGOYA DE SÁNCHEZ et al., 1997; DÍAZ-MUÑOZ et al., 2006).

Mudanças estruturais na mitocôndria foram evidentes a partir da primeira hora de tratamento, mas as alterações funcionais - a exemplo da diminuição na produção de energia, foram observadas após 30 minutos do tratamento. A redução no consumo de oxigênio, quociente respiratório e potencial de membrana foram evidenciadas a partir de 6 h da administração da droga. Contudo, houve uma redução (50%) nas proteínas mitocondriais após 3 h de tratamento, mantida durante 96 h (CHAGOYA DE SÁNCHEZ et al., 1997; DÍAZ-MUÑOZ et al., 2006).

No período de 24-96 h da administração do ISO, houve recuperação parcial de alguns desses parâmetros, mas não foi o caso da síntese de ATP, consumo de oxigênio, nucleotídeos totais de adenina e proteínas mitocondriais (CHAGOYA DE SÁNCHEZ et al., 1997).

Alterações decorrentes da sobrecarga de Ca^{+2} são cruciais na cardiotoxicidade do ISO. A hipóxia prolongada e a ação inotrópica induzida pelo ISO no músculo promove desregulação da homeostase do Ca^{+2} intracelular e modifica o estado redox da célula gerando estresse oxidativo (DEMAUREX; ROSSELIN, 2017). A estimulação β -adrenérgica prolongada causa a morte dos cardiomiócitos (apoptose, necrose ou autofagia), dentre outros mecanismos, através dessa alteração do fluxo de cálcio. Tal

sobrecarga resulta da ativação da adenilato ciclase e depleção de ATP, afetando assim o potencial de membrana e mitocôndria (ZHANG; LI; GE, 2017)

No IM induzido pelo ISO a sobrecarga de Ca^{+2} e o estresse oxidativo são efeitos bem documentados (DEMAUREX; ROSSELIN, 2017) - uma análise do conteúdo total de cálcio nas frações subcelulares revelou que a fração mitocondrial apresentou um conteúdo de Ca^{+2} significativamente elevado (80%) após 30 minutos de tratamento com ISO, atingindo um pico com 6 h (220%) da administração e retornando aos valores normais entre 24-48h, demonstrando assim uma correlação com o desequilíbrio energético (DÍAZ-MUÑOZ et al., 2006).

O estresse oxidativo no IM induzido por ISO gera peroxidação lipídica devido a desbalanço nos sistemas de geração de radicais livres, enzimas antioxidantes e o sistema de glutathione (DÍAZ-MUÑOZ et al., 2006). Além disso, na fase inicial do IM com ISO (primeiras horas 12 h) há uma grande quantidade de $\text{O}_2^{\circ-}$ devido a inibição da SOD e CAT, contudo, após 24 h do infarto ocorre um aumento na atividade da CAT na tentativa de restabelecer as condições basais de H_2O_2 (DÍAZ-MUÑOZ et al., 2006). Todavia, tal elevação na atividade da CAT não é reportada como um resultado recorrente no referido modelo e em outros modelos de infarto do miocárdio (DÍAZ-MUÑOZ et al., 2006; PENDERGRASS KARL D. et al., 2011).

O ciclo da glutathione (glutathione reduzida - GSH e glutathione oxidada - GSSG) e as atividades da glutathione peroxidase (GPx) e reductase (GR) apresentam-se diminuídas durante o infarto induzido pelo ISO - confirmando assim a existência do desbalanço redox, gerando aumento das espécies reativas de oxigênio, bem como diminuição em algumas das defesas antioxidantes neste modelo experimental (DÍAZ-MUÑOZ et al., 2006).

Diversos estudos comprovaram a eficácia do ISO como modelo de IM e suas alterações significativas nos parâmetros hemodinâmicos, bioquímicos, histopatológicos, de estresse oxidativo e necrose moderada no coração (BROOKS; CONRAD, 2009; LOBO FILHO et al., 2011; SUCHAL et al., 2016; JAIN et al., 2018; YU et al., 2018).

Por todo o exposto, o método de IM induzido por ISO tem sido amplamente utilizado na pesquisa para avaliar alterações referentes ao estresse oxidativo, inflamação e apoptose. Ainda, o referido modelo também tem sido empregado para avaliar o efeito protetor de produtos naturais em diferentes espécies animais, por exemplo, em ratos (PRISCILLA; PRINCE, 2009; SUCHAL et al., 2016), camundongos

(BROOKS; CONRAD, 2009) e coelhos (PINELLI et al., 2010). Neste trabalho, a fim de avaliar o efeito cardioprotetor do produto natural d-limoneno (10 μ M), o ISO foi administrado em 150 mg/kg em dois dias consecutivos em camundongos Swiss com o intuito de produzir IM.

2.4. Terpenos

Metabólitos vegetais há muito são utilizados pelos seres humanos na culinária, na cosmética e na medicina. Os terpenos ocorrem amplamente na natureza, representando o maior grupo de moléculas sintetizadas por plantas e têm sido amplamente utilizados na indústria como produtos químicos, agrícolas, odorizantes e saborizantes, além de complexos sintéticos e novos fármacos (LAPCZYNSKI et al., 2008; SOUZA et al., 2015; PAZOUKI; NIINEMETS, 2016).

Os terpenos são classificados de acordo com o número de isoprenos presentes em sua composição em monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (30), tetraterpenos (C40) e politerpenos (várias unidades isoprênicas); e são encontrados em óleos ou em forma de seus derivados oxigenados, tais como álcoois (PAZOUKI; NIINEMETS, 2016).

Os terpenos já são estudados por seus feitos terapêuticos no sistema cardiovascular, por exemplo, os monoterpenos geraniol e nerol que possuem efeitos antiarrítmicos em coração de cobaia (DE MENEZES-FILHO et al., 2014; MENEZES-FILHO et al., 2019). Outro monoterpeno, o mirtenol, possui atividade antioxidante e antiapoptótica contra injúria causada pela IR em modelo de isquemia global em coração de rato (BRITTO et al., 2018). Ainda outros terpenos como o carvacrol (AYDIN et al., 2007), eucaliptol (LAHLOU et al., 2002), (\pm)-Citronelol (BASTOS et al., 2010), (\pm)-Linalool (ANJOS et al., 2013) entre outros, possuem propriedades hipotensoras em diversos modelos de hipertensão arterial (induzida por L-NAME, induzida por aterosclerose, ratos SHR - essencialmente hipertensos) (ALVES-SILVA et al., 2016). Além das propriedades sobre o sistema cardiovascular os terpenos possuem outras atividades sobre os sistemas fisiopatológicos, a exemplo do diterpeno conhecido como taxol, isolado da casca da *Taxus brevifolia* Nutt, que tem importante ação antitumoral comprovada para câncer de pulmão, mama, ovário e leucemia, sendo sintetizado e utilizado na terapêutica clínica sob o nome de paclitaxel (PCX) (GODARD, ; LAPCZYNSKI et al., 2008).

Dentre os terpenos, os monoterpenos são os principais compostos encontrados nos óleos essenciais, representando 90% dos componentes. São moléculas constituídas por 10 átomos de carbono formando duas unidades isoprênicas (PAZOUKI; NIINEMETS, 2016). Na maior parte das vezes os monoterpenos são substâncias voláteis em decorrência de seu baixo peso molecular. O complexo mais comumente encontrado é o pirofosfato de geranila (GPP), com uma ligação dupla, o que permite reações com formação de isômeros, oportunizando vários tipos monoterpênicos (a exemplo: geraniol, nerol) (MAßBERG et al., 2015).

Os monoterpenos têm sido substâncias de interesse em pesquisa, uma vez que seus óleos essenciais exercem várias ações benéficas no organismo, a exemplo da ação analgésica e anti-inflamatória (ARAÚJO-FILHO et al., 2017), antifúngica, antimicrobiana, anticancerígena e antioxidante (DA FONSECA et al., 2011). No que se refere ao sistema cardiovascular, já foram comprovadas algumas ações específicas como propriedades hipotensora, vasorrelaxadora e antiaritmica (SANTOS et al., 2011; BRITTO et al., 2018; MENEZES-FILHO et al., 2019). Dentre os terpenos, têm-se o monoterpeno d-limoneno, produto natural de grande recorrência cuja propriedade antioxidante já foi comprovada (BAI et al., 2016).

2.4.1. D-Limoneno

O Limoneno (p-menta-1,8-dieno) é o monoterpeno presente em maior quantidade nos óleos essenciais – substância extraída de plantas aromáticas, sendo obtido da casca de plantas cítricas e níveis mais baixos em legumes. É portanto, o monoterpeno natural mais frequente, sendo o d-limoneno sua principal forma (Fig. 4) - um álcool monoterpênico encontrado em óleos essenciais extraídos principalmente das cascas de limões e laranjas (BACANLI et al., 2017).

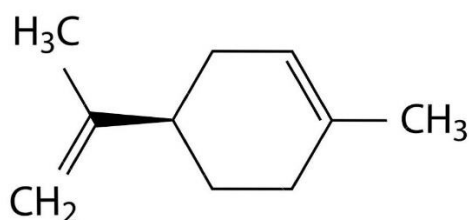


Figura 04. Estrutura química do d-Limoneno

Devido a sua agradável fragrância cítrica, o d-limoneno é utilizado como um aditivo de sabor e fragrância em perfumes, sabões, alimentos, gomas de mascar e bebidas, uma vez que já é reconhecido como seguro pelo código de regulação federal como agente saborizante/odorizante (BACANLI et al., 2017). A ingestão de d-limoneno varia dependendo do tipo de alimento (aditivo de sabor ou no alimento natural), estando em média seu consumo diário entre 16 a 90 mg/dia (SUN, 2007).

Estudos já comprovaram alguns efeitos benéficos do d-limoneno, como sua capacidade antioxidante, ação reguladora na hiperglicemia produzida na Diabetes e seu efeito antígeno tóxico contra o peróxido de hidrogênio (BACANLI et al., 2017).

A absorção do d-limoneno através do trato gastrointestinal é rápida e quase completa, tanto em animais como em humanos. Ele é rapidamente metabolizado pelos diferentes tecidos, com acúmulo superior encontrado em tecidos com maior concentração de adipócitos. Sua meia vida no organismo humano é de no máximo 24 h, é metabolizado por metabólitos oxigenados em humanos e animais (ratos) sendo sua excreção realizada principalmente pela urina (SUN, 2007).

Um dos metabólitos do d-limoneno é o ácido perílico. Estudos evidenciaram altas concentrações de ácido perílico uma hora após a ingestão de d-limoneno em limonada, todavia essa concentração reduz rapidamente com o tempo, sendo indetectável após 24 h do consumo. Estudo com seres humanos, embora tenha sido reportado alguns efeitos adversos como tenesmo e aumento da peristalse, não demonstrou alteração na funcionalidade hepática, renal e pancreática (SUN, 2007).

Pesquisas já comprovaram que o d-limoneno tem toxicidade considerada muito baixa, mesmo com doses repetidas por um ano (SUN, 2007), além de possuir ação anticancerígena (CHIDAMBARA MURTHY; JAYAPRAKASHA; PATIL, 2012), antidepressiva (KOMIYA; TAKEUCHI; HARADA, 2006) e antioxidante (ROBERTO et al., 2010). Ainda, também foi demonstrado a ação hipotensora d-limoneno sobre a pressão sanguínea (WANG; LI; SHEN, 2018).

Embora seu mecanismo de ação não esteja totalmente elucidado, estudos que avaliaram a ação do d-limoneno na dor apontam para a possibilidade de ação nos receptores TRPV1 e ácido gama aminobutílico – GABA (ARAÚJO-FILHO et al., 2017) e estudos relacionados à ação no sistema nervoso central também relacionaram sua ação ao sistema GABAérgico (PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006).

Comprovada as propriedades terapêuticas do d-limoneno, o mesmo também é de fácil obtenção, podendo ser encontrado em diferentes porcentagens em plantas,

frutas e vegetais tais como a cidra (*Citrus medica*), laranja (*Citrus vulgaris, aurantium, sinensis*), tangerina (*Citrus reticulata*), aipo (*Apium graveolens*) e limão (*Citrus limon*). Só em relação ao limão, existem em torno de setenta variedades no mundo, dentre as quais: limão taiti (*Citrus latifolia*), limão siciliano (*Citrus lemon*), limão galego (*Citrus aurantiifolia*) dentre outros, podendo a concentração do limoneno chegar a 70% na casca da tangerina, 65% na casca do limão e 90% na casca da laranja (HARA; KISHIMOTO; KUBOI, 1999; REDAKTION, 2003).

O Brasil detém a maior citricultura do mundo, sendo que 10% de toda a produção nacional de citros está concentrada na região Nordeste, retendo 90% da área plantada os estados de Sergipe e Bahia. Nesse contexto, o estado de Sergipe destaca-se como quarto maior produtor de citros, com aproximadamente 840 mil toneladas de frutos, dentre os quais encontram-se laranjas, limões e tangerinas - a cultura de citros no estado é forte, gerando em torno de 3% do Produto Interno Bruto. As áreas de plantio são, na sua maioria, de base familiar e estão distribuídas na região do estado conhecida como Tabuleiros Costeiros (sul do estado), abarcando as cidades de Arauá, Boquim, Cristinápolis, Estância, Indiaroba, Itaporanga D'Ajuda, Itabaianinha, Lagarto, Pedrinhas, Riachão do Dantas, Salgado, Tomar do Geru, Umbaúba e Santa Luzia do Itanhy (CONCEIÇÃO, 2011).

Por todo o exposto, acredita-se ser de valia tal estudo – não apenas pelo ineditismo no que refere à avaliação do efeito cardioprotetor do d-limoneno sobre o IM, mas também pela possibilidade do impacto financeiro no custeio ao tratamento de uma patologia que hodiernamente pode ser encarada sob as proporções de uma pandemia.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo Geral*

Avaliar o efeito do d-limoneno em modelo de IM em coração de camundongo.

3.2. *Objetivos Específicos*

O trabalho visa abordar os seguintes efeitos do d-limoneno sobre o IM induzido por isoproterenol em coração de camundongo Swiss:

1. Alterações eletrocardiográficas.
2. Área de infarto.
3. Alterações histológicas.
4. Produção de EROs.
5. Atividade de enzimas antioxidantes SOD e CAT.
6. Atividade antioxidante não enzimática do d-limoneno.
7. Resposta sobre as proteínas anti e pró-apoptóticas.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, pesando entre 15 a 30g, reproduzidos, criados e mantidos pelo Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas numa temperatura de 20-25°C, e foram alimentados livremente com ração comercial e água *ad libitum*.

O número total de animais utilizados para o desenvolvimento do trabalho foi de 66, sendo projeto previamente submetido ao Comitê de Ética de Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe em 01/02/2018, sob o protocolo nº09/2018, sendo aprovado pelo mesmo (ANEXO 1). A taxa de mortalidade no desenvolvimento do trabalho foi de 20% no grupo infarto do miocárdio.

4.2. Substâncias e sais

As seguintes drogas foram adquiridas na Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA): d-limoneno (pureza 97%), (-)-isoproterenol, 2,3,5-tetracloreto de trifeniltetrazólio (TTC), dihidroetidio (DHE; Molecular Probes), hematoxilina e eosina, 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), cloreto férrico e sulfato ferroso. As seguintes drogas foram adquiridas na Merck (Darmstadt, Germany): dimethyl sulfoxide (DMSO), quetamina, xilazina, Na₂HPO₄ anidro, NaCl, KCl, KOH, MgCl₂, NaHCO₃, CaCl₂, NaH₂PO₄ anidro, NaOH e glicose. A heparina fora adquirida na Roche (São Paulo, Brazil).

4.3. Isquemia induzida por isoproterenol e tratamento com d-limoneno

O infarto foi induzido por duas doses de 150 mg/kg de isoproterenol, num intervalo de 24 h (MORADI-ARZELOO et al., 2016). Para padronização da concentração utilizada em cada animal, a dose do d-limoneno (10 µM) foi calculada usando o volume sanguíneo médio relatado de 7,8 mL por 100 g de peso corporal de murino (O'CONNELL et al., 2015), um camundongo pesando 25 g teria, portanto, um volume total de sangue de 1,95 ml. O isoproterenol e o d-limoneno foram diluídos em

DMSO (0,1%) e salina (NaCl 0,9%). Os experimentos foram divididos em 4 grupos: controle (veículo - salina+DMSO), infarto do miocárdio - IM (veículo + 150mg/kg isoproterenol), d-limoneno - DL (veículo + 10 μ M d-limoneno) e IM + DL (veículo + isoproterenol + d-limoneno).

Ambas as drogas foram administradas via intraperitoneal, em duas doses – sendo estas separadas por um intervalo de 24 h. No grupo IM + DL foi feita a administração do d-limoneno 30 minutos após a administração do ISO.

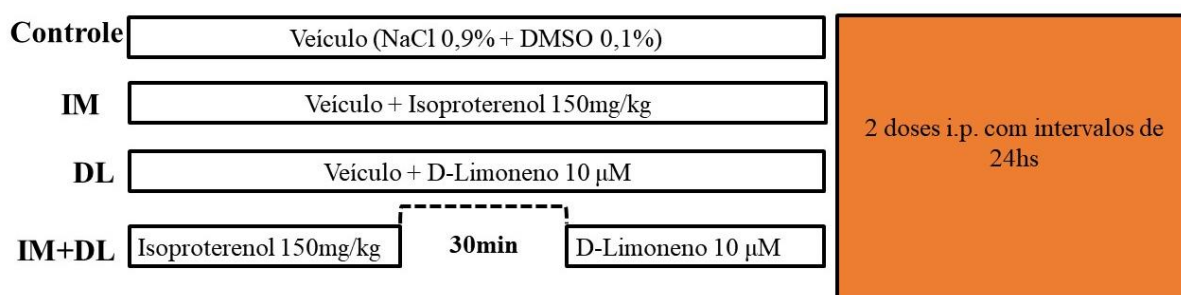


Figura 05. Formatação dos grupos utilizados no estudo.

4.4. Aquisição do perfil eletrocardiográfico - ECG

Após a isquemia, o eletrocardiograma (ECG) foi registrado usando eletrodos de superfície.

As medidas de ECG de superfície foram realizadas com os animais anestesiados por injeção i.p. de quetamina (90 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), através de eletrodos subdérmicos colocados na derivação de DII (pólo negativo localizado no braço direito e pólo positivo na perna esquerda) conectados a um cardioscópio (TEB *eletronics*, Brasil), os sinais elétricos foram amplificados e digitalizados (PowerLab 4/35 ADInstrument, EUA). Os sinais de ECG foram registrados por 5 minutos e para análise dos parâmetros determinou-se o eixo elétrico de P, QRS e T; posteriormente para avaliação dos intervalos PR, QT, complexo QRS e frequência cardíaca utilizou-se o programa LabChart 8 (ADInstrument, EUA). O intervalo QT foi corrigido normalizado para roedores usando a equação de Bazett modificada ($QT_c = QT / \sqrt{RR / f}$), sendo $f = 336$. As anomalias na morfologia do segmento ST para avaliação do infarto do miocárdio também foram analisadas (PREDA; BURLACU, 2010).

4.5. Análises da área de infarto

A área de lesão do miocárdio foi analisada utilizando o método de coloração com 2,3,5-tetracloreto de trifetil-tetrazólio (TTC). Todos os corações foram seccionados transversalmente na região mediana para maior exposição do ventrículo esquerdo. A região do ápice cardíaco (vide figura 6) foi colocada em um falcon contendo TTC (1%) diluído em Krebs-Henseleit (composição em mM - NaCl 120, KCl 5,4, MgCl₂ 1,2, NaHCO₃ 27, CaCl₂ 1,25, Glicose 11, NaH₂PO₄ 2,0, pH 7,4) por 15 min em banho-maria a 37°C. A área normal de desidrogenases é corada de vermelho enquanto a zona necrótica permanece não corada, devido à perda da enzima NADH (necessária à atividade das desidrogenases). Após a coloração a área ventricular foi escaneada em alta resolução, selecionou-se a área total e a área não corada, sendo a análise realizada pelo *software ImageJ* (software free verso ImageJ bundled with 64-bit Java 1.8.0_112, NIH, USA).

4.6. Análises histopatológicas

Após os procedimentos experimentais, os camundongos anestesiados por injeção i.p. de quetamina (90 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) foram decapitados, os corações foram rapidamente removidos (vide figura 6), lavados em KCl (1 Molar), cuidadosamente limpos e então fixados em formalina (10%) tamponada, pH 7,0-7,2, contendo fosfato de sódio monobásico anidro (4g/L) e fosfato de sódio dibásico anidro, (6,5g/L) após 72 h foram embebidos em parafina e cortados a 5 µm de espessura e posteriormente corados com hematoxilina-eosina.

Para a coloração, foram realizadas inicialmente 2 trocas de xilol de 10 minutos cada, sendo as lâminas passadas em 2 mudanças de álcool absoluto de 5 minutos cada (álcool 99% por 2 minutos e álcool 95% por mais 2 minutos) e então mantidas em água destilada por 4 minutos. Após, foram colocadas em solução de hematoxilina Harris por 8 minutos, lavadas em água corrente por 5 minutos e diferenciadas em 1% de álcool ácido por 30 segundos, sendo novamente lavadas com água corrente por 1 minuto, mantidas em água amoniacal 0,5% por 30 segundos a 1 minuto, lavadas em água corrente por 5 minutos e enxaguadas em álcool a 95% (10 mergulhos), para então passarem pela contracoloração em solução de eosina/eosina-floxina por 30 segundos a 1 minuto, sendo desidratadas através de álcool a 95% (2 mudanças de

álcool 5 minutos cada) e limpas em 2 trocas de xilol, 5 minutos cada (MALATESTA, 2016).

4.7. Mensuração do ânion superóxido pelo método de fluorescência com dihidroetídio (DHE)

Para medidas de geração de EROs os corações foram rapidamente removidos (vide figura 6) e congelados em um meio para criosecção (composto Tissue-Tek, O.C.T.). Os blocos de tecido congelado foram cortados, com o auxílio do criostato mantendo a temperatura de -20°C, transversalmente em secções de 20 µm de espessura e as lâminas foram transferidas para uma câmara de gravação. As lâminas foram pré-incubadas em uma solução de PBS pré-aquecida durante 15 min e depois carregadas com 10 µM de dihidroetídio (DHE; Molecular Probes), uma probe celular permeável, durante 40 min a 37°C (SANTANA et al., 2018). As imagens foram gravadas usando um microscópio de fluorescência (Ci-E, Nikon, Japão) usando um comprimento de onda de excitação de 480 nm, sendo obtidos valores de emissão de fluorescência acima de 500 nm, e a intensidade de fluorescência DHE foi medida usando o *software ImageJ 1.38x (software free version ImageJ bundled with 64-bit Java 1.8.0_112, NIH, USA)*.

4.8. Determinação da concentração total de proteínas

Para mensurar a concentração total de proteínas presentes no tecido cardíaco (vide figura 6) estudado foi utilizado o método de dosagem proteica descrito por Bradford (BRADFORD, 1976). As amostras foram homogeneizadas em PBS (50 mM/pH 7,4) por 15 segundos, e 5 min em gelo, para evitar aquecimento da amostra. Após esse procedimento as amostras homogeneizadas foram centrifugadas para remover os detritos celulares (10.000 rpm; 10 min) e o sobrenadante foi recolhido. Todos os resultados foram normalizados quanto ao teor de proteína utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

4.9. Mensuração da lipoperoxidação pelo método de TBARs

A mensuração da peroxidação lipídica consistiu em quantificar o malonaldeído (MDA), um dos produtos da oxidação dos hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados, que se forma durante o processo da lipoperoxidação (BRITTO et al., 2018).

Para a realização dos experimentos os corações foram pesados e homogeneizados (vide figura 6), na proporção de 100 mg de tecido/mL de tampão fosfato (0,1 mol/L, pH 7,4). Em seguida, os homogeneizados foram incubados durante 45 minutos a 90°C com solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBARS 0,37%), em solução ácida (15% de ácido tricloroacético- TCA e 0,25 N de ácido clorídrico) (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990). As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm (Neofuge 15R, HEAL FORCE®, EUA) por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi misturado com n-butanol e solução saturada de NaCl. A mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos e novamente centrifugada a 14.000 rpm (Neofuge 15R, HEAL FORCE®, EUA) por 2 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram pipetadas em placas de 96 poços para a leitura de absorbância em leitor de microplaca (Biotek, ELx800 Absorbance Microplate Reader, EUA) a 535 nm, corrigindo pelos valores de absorbância a 572 nm. A quantidade de MDA foi expressa em nanomoles por mg de tecido (nM/mg), sendo interpretada como marcador de peroxidação lipídica formado pela reação com o TBARS.

4.10. Mensuração da carbonilação e sulfidrilção de proteínas

A carbonilação mensura a reação do 2,4 - dinitrofenilhidrazina (DNPH) com cetonas ou aldeídos reativos para formar hidrazonas, que são formados apartir da oxidação protéica, sendo a absorbância lida no comprimento de onda entre 360-385 nm.

Inicialmente, dois *ependorffs* foram preparados, um experimental (DNPH) e um controle (branco), sendo adicionado 1 mg de proteína (vide figura 6) do sobrenadante em ambos e após completados com PBS para normalizar o volume em 200 µl. Então adicionou-se 200 µl de TCA a 20%, homogeneizando por 5 minutos e após, prosseguiu-se centrifugação a 4000 rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo o pellet em 100 µl de NaOH 0,2 mol/L.

A seguir de tais procedimentos, acrescentou-se 100 µl de ácido clorídrico (HCl) 2 M no tubo branco e 100 µl de DNPH 10 mM na amostra e em seguida 100 µl de TCA 20%, procedendo centrifugação a 16000 rpm/5 minutos por 3 vezes. Após, foram acrescentados 500 µl de etanol e acetato de etila (1:1), ressuspendendo-se o pellet e procedendo centrifugação por 16000g/5 minutos. Ao término, ressuspendeu-se o pellet com 1 ml de ureia 8 M, pH 2,3, centrifugando 3 minutos a 16000 rpm/4 minutos,

para remover possíveis materiais insolúveis, sendo então transferidos 200 µL para placa de 96 poços comum.

Para mensurar a quantidade de grupamentos sulfidrilas (SH) foi considerado o preconizado por Aksenov e Markesbery (2001). Os tecidos cardíacos (vide figura 6), após igualados em tampão fosfato (PBS 50 mmol/L, pH 7,4), passaram por centrifugação (12.000 rpm por 30 min, a 4°C) e após o sobrenadante foi associado ao Tris-EDTA (200 mmol/L, 2 mmol/L, pH 8,2). A leitura espectrofotométrica inicial foi realizada a um comprimento de onda de 412 nm, sendo em sequência adicionado DTNB (10 mmol/L, em metanol) e prosseguido nova leitura após 15 min, mantendo o comprimento de onda. A concentração total de grupamentos SH fora expressa em nmol/L/µg de proteína (AKSENOV; MARKESBERY, 2001).

4.11. Mensuração das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)

A mensuração da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT procedeu-se da seguinte forma: os tecidos cardíacos (vide figura 6) foram pesados e igualados (100 mg de tecido/mL de tampão fosfato - 50 mmol/L, pH 7,4). Após os espécimes passaram por centrifugação a 14.000 rpm (Neofuge 15R, HEAL FORCE®, EUA) durante 30 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante utilizado nos testes. Fez-se a mensuração da atividade de SOD conforme Madesh e Balasubramanian (1998): o teste calculou a formação de $O_2^{\bullet-}$ pela auto-oxidação da adrenalina. Os tecidos cardíacos foram igualados em tampão fosfato PBS (50 mmol/L, pH 7,4) e, então, centrifugados a 12.000 rpm por 30 minutos. A reação foi feita por pipetagem em triplicata na placa de Elisa com o sobrenadante, PBS e adrenalina (60 mM), sendo vibrados por 5 minutos e após adicionado dimetilsulfóxido (DMSO), com a leitura realizada em espectrofotômetro de microplaca a 570 nm (ELx 800, BIOTEK Instruments®, EUA). A atividade da SOD foi expressa em unidade de SOD por micrograma de proteína (MADESH; BALASUBRAMANIAN, 1998).

A atividade da catalase foi mensurada conforme Nelson e Kiesow (1972). Deu-se início a reação com a adição de H_2O_2 (0,3 mol/L) às amostras do sobrenadante, que foram igualadas em tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,0) e centrifugadas (Neofuge 15R, HEAL FORCE®, EUA) a 12.000 rpm, durante 30 minutos, a 4°C. O teste foi realizado em cubeta de quartzo com o ambiente salvaguardado de iluminação, sendo as medidas feitas em espectrofotômetro (ELx 800, BIOTEK Instruments®, EUA), com

periodicidade de 15 segundos, a 25°C, sendo o comprimento de onda de 240 nm. Através da mensuração do consumo de H₂O₂ (0,3 mol/L) quantificou-se a reação. A dismutação do H₂O₂ pela CAT foi acompanhada por 1 minuto a 25°C. A atividade da enzima fora expressa pela diferença da variação das absorbâncias (ΔE)/minuto/micrograma de proteínas (NELSON; KIESOW, 1972).

4.12. Mensuração do potencial antioxidante do d-limoneno

Para avaliar a capacidade antioxidante do d-limoneno procedeu-se análise da atividade do fator antioxidante redutor férrico (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) – FRAP, como descrito por Benzie e Strain (1996). Em placa de 96 poços adicionou-se 10 μ M de d-limoneno diluído em DMSO 0,1%, solução tampão acetato (0,3 mol/L - pH 3,6), 27 μ L de água destilada, TPTZ – 10 mmol/L e cloreto férrico (FeCl₃ – 20 mmol/L). Seguiu-se incubação da mistura reacional a 37°C por 30 minutos, sendo a absorbância posteriormente mensurada a 595 nm. O FRAP foi calculado a partir da curva padrão gerada pelo FeSO₄ (sulfato ferroso) sendo então utilizada equação linear. Os valores foram comparados e expressos em μ g/ml⁻¹ (BENZIE; STRAIN, 1996).

4.13. Expressão de proteínas Bax/Bcl2 e pró-caspase 3

Para avaliar o efeito do d-limoneno sobre a expressão das proteínas das vias de sinalização pró e antiapoptótica, prosseguiu-se análises pelo *Western Blotting*. Os tecidos cardíacos (vide figura 6) foram igualados em tampão de lise gelado (em mM: 100 NaCl, 50 trisbase, 5 EDTA.2 H₂O e 1 MgCl₂, pH 8,0) sendo 0,3% de triton X100, 1% de nonidet P40, 0,5% de desoxicolato de sódio, 20 mM NaF com protease (# P8340, Sigma-Aldrich), coquetéis inibidores da fosfatase (# P0044, Sigma-Aldrich) e ditiotretitol (DTT, 1 mM). Após a homogeneização no tampão de lise, as amostras foram centrifugadas por 12 minutos a 6000 g a 4 °C. Posteriormente foram quantificadas as proteínas do sobrenadante pelo método de Bradford. Quantidade equivalente de proteína em gel de poliacrilamida com SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) de 7,5% ou 10%, foi transferida para membrana de nitrocelulose (Millipore®, USA), sendo bloqueados à temperatura ambiente com solução de BSA a 4% e incubados com os anticorpos primários: anti-Bax (1:500, sc-526, Santa Cruz Biotechnology Inc-Santa Cruz, EUA), anti-Bcl-2 (1:500, sc-492 Santa Cruz Biotechnology Inc-Santa Cruz, EUA) e pró-caspase 3 (1:1000, sc-7272 Santa

Cruz Biotechnology Inc-Santa Cruz, EUA) por 12 h. Em seguida, a membrana foi submetida a tripla lavagem com TBS-T (*tris-buffered saline Tween 20*) por 5 minutos e incubada por 2 h com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (HRP 1:5000, anti-goat IgG-HRP ou anti-rabbit IgG-HRP, Sigma, St Louis, EUA) diluído em 1% de albumina em TBS-T. Depois do intervalo de incubação a membrana foi mais uma vez submetida a tripla lavagem com TBS-T por 5 minutos. O complexo imune foi revelado e visualizado em sala escura. Utilizou-se a quimiluminescência melhorada (Luminata strong™ - substrato HRP Ocidental, Merck-Millipore) e detecção com equipamento LAS 4000 (GE HealthCare Life Science) para efetuar a imunodetecção. As proteínas foram quantificadas por análise densitométrica com o software *ImageJ 1,38x* (NIH).

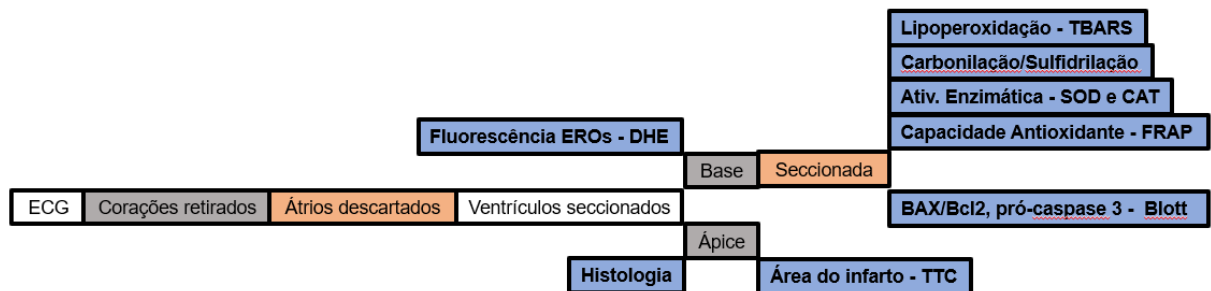


Figura 06. Fluxograma de experimentação e variáveis mensuradas.

4.14. Análise estatística

Para a sistematização e observação dos resultados, os dados foram tabulados e com eles realizados os gráficos pertinentes (Excel, GraphPad Prism). Todos os dados foram expressos como média \pm Erro Padrão Médio (EPM), e o número de animais foi mostrado como n. A normalidade e a igualdade de variância foram verificadas pelo teste de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para a decisão estatística, utilizou-se o teste ANOVA *one-way*, seguido de teste de Tukey ou teste qui-quadrado, a depender do caso. Valores de probabilidade de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. *D-limoneno impede alterações no perfil eletrocardiográfico e elevação do segmento ST induzidas por lesão de IM*

Durante o processo isquêmico do miocárdio, ocorrem mudanças no perfil eletrocardiográfico decorrentes de alterações na despolarização cardíaca e na capacidade de propagação do impulso elétrico devido ao desarranjo estrutural na membrana plasmática e alterações nas conexões entre os cardiomiócitos. Para avaliação clínica rápida dessas alterações o exame mais utilizado é o registro do ECG. Portanto, para avaliar se o d-limoneno atenuava as alterações eletrocardiográficas causadas pela lesão de IM, os sinais de ECG foram registrados.

Os traçados representativos do ECG dos 4 grupos experimentais estão exibidos na Figura 07A, onde pode-se observar as ondas e intervalos dos ECGs avaliados e nestes. Importante observar que na Figura 07B os animais infartados apresentaram elevação do segmento ST em 70% ($n = 6$, $*p > 0,05$) dos animais, que foi reduzida para 30% ($n = 6$, $*p > 0,05$) nos animais tratados com d-limoneno. Não houve alterações no intervalo PR e no complexo QRS. Contudo, foram observados aumento do QTc e na frequência cardíaca nos animais infartados, apresentando aumento de $71,66 \pm 6,60\text{ms}$ para $102,9 \pm 5,04\text{ms}$ e $332,7 \pm 20,96\text{bpm}$ para $500,60 \pm 13,69\text{ bpm}$ (controle vs IM, respectivamente) sendo revertido pelo tratamento com d-limoneno (Figura 07C-F).

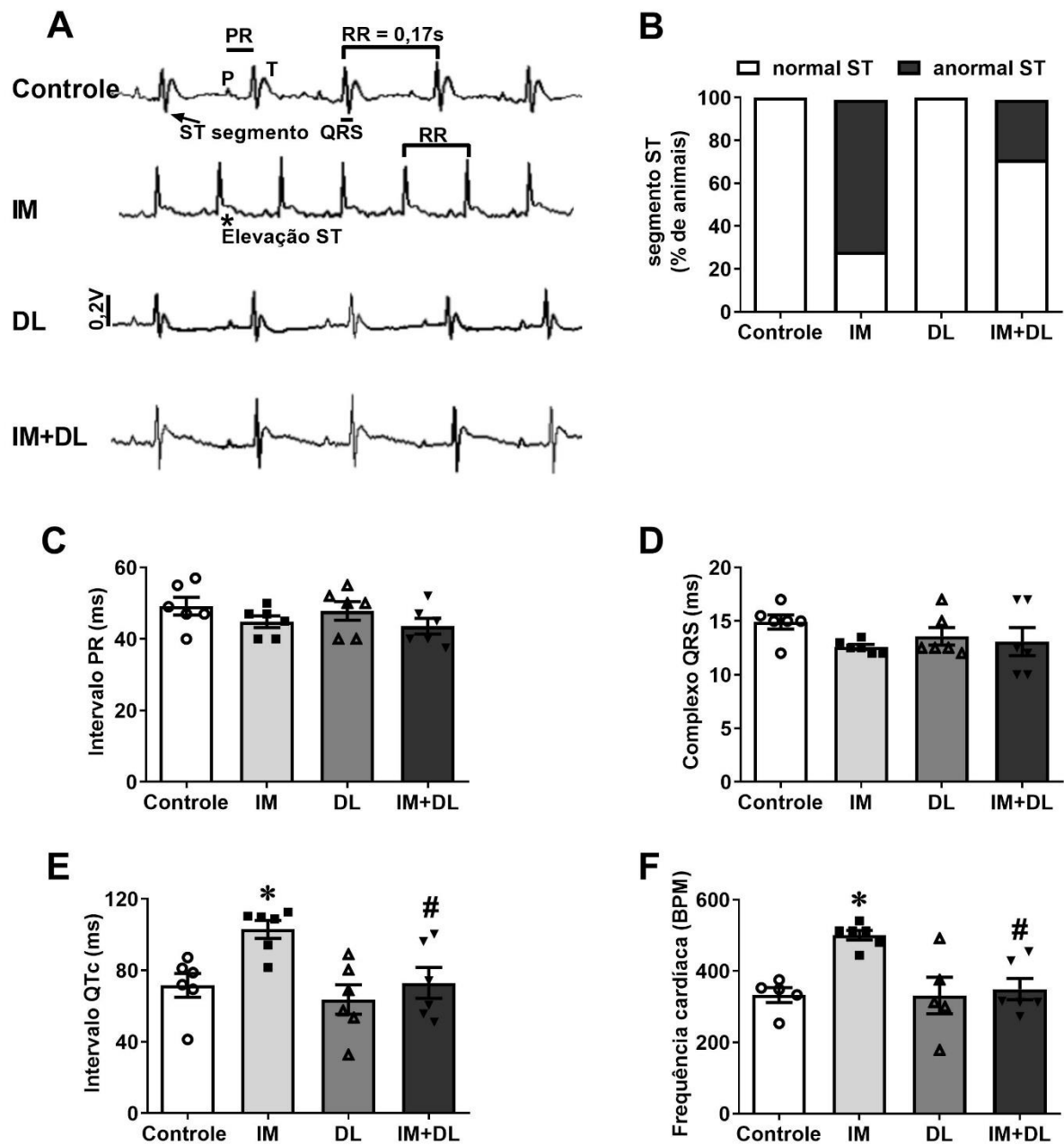


Figura 07. D-limoneno impede alterações no perfil eletrocardiográfico e elevação do segmento ST induzidas por lesão de IM. **A**, traçados representativos de ECG avaliados nos grupos experimentais (seta indica o padrão normal do segmento ST, enquanto que o asterisco destaca a elevação do segmento ST); **B**, anormalidades do segmento ST; **C**, intervalo PR; **D**, complexo QRS; **E**, intervalo QT corrigido pela frequência cardíaca normalizada para rato e camundongo (QTc); **F**, frequência cardíaca. Os dados foram representados como médias \pm EPM (n = 6). * p < 0,05 (IM) vs. (Controle); # p < 0,05 (DL+IM) vs. (IM). ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. Para **B** foi usado teste qui-quadrado.

O IM é a mais comum causa de morte em adultos, e dentre as ocorrências desfavoráveis relacionadas ao infarto, a disfunção ventricular esquerda está presente como preditor comprovado de eventos adversos, desencadeando em grande parte o desenvolvimento de arritmias cardíacas e/ou insuficiência cardíaca. Durante a isquemia o dano miocárdico estrutural promove um desequilíbrio eletrolítico devido a disfunção de canais iônicos responsáveis por gerar a repolarização, que combinado com um aumento da atividade simpática para suprir o déficit do miocárdio lesionado pode originar prolongamento do intervalo QT e aumento da frequência cardíaca (TYAN et al., 2018).

As anormalidades da repolarização ventricular que levam a alterações morfológicas patológicas na onda T ou no segmento ST, além de um marcador de cardiomiopatia estrutural, são reconhecidamente associadas à morte miocárdica e pior prognóstico no IM (DĘBIŃSKI, KONDYS, BUSZMAN, 2017; NEUMANN *et al.* 2018), e isso também pode ser mostrado para o prolongamento do QTc.

O mecanismo pelo qual o prolongamento do intervalo QTc poderia prever um resultado adverso ainda não é exatamente conhecido. Além de representar uma dificuldade na repolarização ventricular – o que prejudica uma nova despolarização, distúrbios nos cardiomiócitos que geram sobrecarga de cálcio promovem aumento do intervalo QT e aumentam a suscetibilidade a arritmias ventriculares (SCHWARTZ PETER; CROTTI; INSOLIA, 2012). Além disso, o papel do QTc no complexo quadro de doença cardíaca isquêmica também é demonstrado por uma melhora da fração de ejeção em pacientes sem QTc prolongado durante o processo de infarto (ROBBINS et al., 2003). A literatura mostra que o QTc prolongado pode ser considerado um preditor de doença coronariana (ROBBINS et al., 2003). Consequentemente, está associado ao envelhecimento, hipertensão arterial, doença arterial coronariana (RAUTAHARJU et al., 1994; FESTA et al., 2000) e diabetes (DEKKER et al., 1996; MONNERAT et al., 2016). Dadas essas correlações relevantes, não é inesperado dizer que o prolongamento do intervalo QTc tem valor prognóstico para futuros eventos cardiovasculares, como infarto do miocárdio.

Outro ponto importante é o aumento da frequência cardíaca após o IM, o que leva ao desgaste cardíaco por promover aumento do gasto energético e, consequentemente, aumento da lesão cardíaca (CHOE et al., 2018). Pacientes que após o IM permanecem com frequência cardíaca alta têm maior risco de morte durante o primeiro ano (SERONDE et al., 2014), sendo necessário o uso de betabloqueadores

- salvo em contra indicações, tais como pacientes com sinais de insuficiência cardíaca aguda (classe Killip II), pressão arterial sistólica > 120 mmHg, baixo débito cardíaco e bloqueio atrioventricular (NEUMANN et al. 2018; IBANEZ et al. 2018).

Podemos observar que a utilização do d-limoneno atenuou o aparecimento da elevação do segmento ST e impediu o aumento do intervalo QTc e da frequência cardíaca, portanto, podemos inferir com essas observações que o d-limoneno protege o coração do aparecimento de alterações relacionadas a pior prognóstico no IM. Assim sendo, investigou-se a área de infarto, já que as alterações no segmento ST e onda T refletem aumento da lesão isquêmica cardíaca.

5.2. D-limoneno promove cardioproteção reduzindo a área do infarto e prevenindo alterações histológicas do miocárdio induzidas por lesão de IM

A área do infarto caracteriza um dos principais determinantes dos desfechos cardíacos após o IM com supradesnivelamento do segmento ST (IBANEZ et al., 2018b), sendo o tamanho do infarto, convencionalmente, ligado a duração da oclusão coronariana com redução do fluxo sanguíneo colateral (ANDERSON; MORROW, 2017).

O modelo utilizado neste trabalho mimetizou, a contento, o IM à medida que gerou alterações eletrocardiográficas. Observou-se um notável aumento na área do infarto do miocárdio no grupo IM ($50,96 \pm 12,46 \%$, $*p < 0,05$) quando comparado ao controle (Figura 08A). Por outro lado, o tratamento com d-limoneno minimizou ($8,24 \pm 2,08 \%$, $^{\#}p < 0,05$) a extensão do tamanho da área infartada, promovendo cardioproteção. Diversos trabalhos têm demonstrado, em diferentes modelos experimentais de indução de IM, que lesões aproximadamente de 50% ou mais da área infartada do coração representam uma lesão grave com elevada probabilidade de insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida e mortalidade (BRITTO et al., 2018; IBANEZ et al., 2018b; SANTANA et al., 2018) .

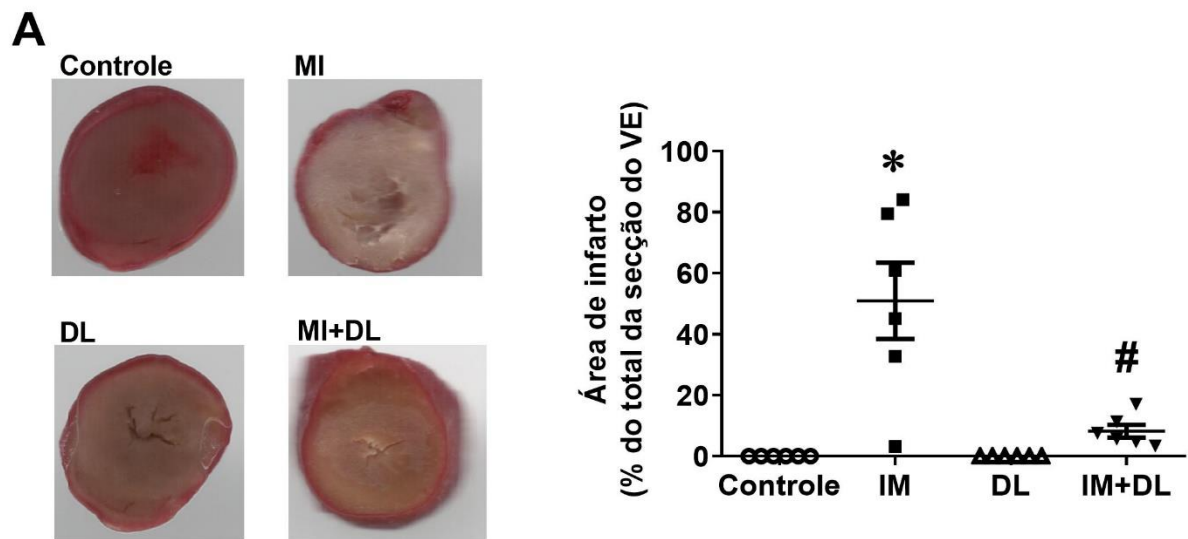


Figura 08. D-limoneno promove cardioproteção reduzindo a área do infarto e prevenindo alterações histológicas do miocárdio induzidas por lesão de IM. A, imagens representativas da área de infarto nos grupos experimentais estudados (painel superior) e análise quantitativa do tamanho do infarto expresso em porcentagem da área total do ventrículo esquerdo (VE) (painel inferior). Os dados foram representados como médias \pm EPM ($n = 5$). * $p < 0,05$ (IM) vs. (Controle); # $p < 0,05$ (DL+IM) vs. (IM). ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey.

Pode-se observar na Figura 09 (direita, painel B) que os corações do grupo IM apresentaram dano na estrutura do miocárdio ventricular esquerdo, focal ou difuso, evidenciado no 3º dia após o início do protocolo de isquemia com isoproterenol. As fibras musculares cardíacas afetadas apresentaram descontinuidade, degeneração, espaçamento amplo e vacuolações nos miocárdios. Infiltração de células mononucleares, congestão de capilares e vasos sanguíneos também foram encontrados (Figura 4, $n = 5$) (NOUR et al., 2017). Em contraste, no tecido cardíaco do grupo tratado com DL tais situações foram mitigadas ou prevenidas (painel D).

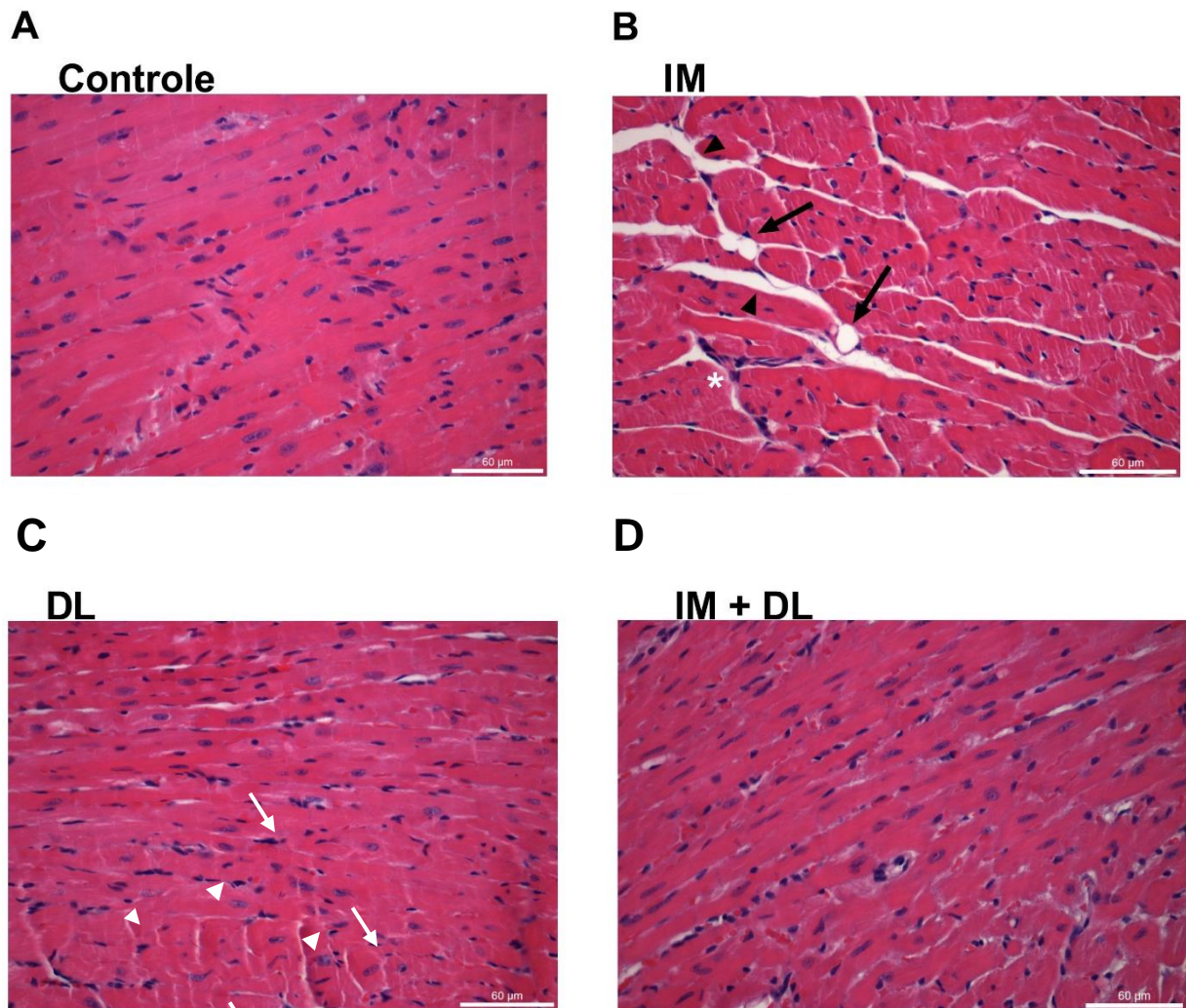


Figura 09. Alterações histológicas do miocárdio induzidas por lesão de IM. **A**, ventrículo esquerdo do grupo controle, mostrando as fibras musculares cardíacas estriadas ramificadas longitudinalmente e anastomosadas com núcleos vesiculares ovais centrais (setas), e núcleos planos de células mononucleares (cabeças de setas) vistos no endomísio fino entre as fibras. **B**, mostrando ventrículo esquerdo do grupo IM, apresentando infiltração de células mononucleares (asterisco branco), descontinuidade, degeneração, espaçamento amplo (cabeça de seta) e vacuolações nos miocárdios (setas). **C**, ventrículo esquerdo do coração tratado com d-limoneno. **D**, imagem do tecido que sofreu IM e tratamento com d-limoneno. Colorimetria com H&E, objetiva microscópica 40x.

O infiltrado de células inflamatórias na lesão de IM miocárdica com isoproterenol em modelo animal é um achado já relatado na literatura (GOYAL et al., 2010; HUANG et al., 2018). Dentre tais células têm-se macrófagos - células do sistema imune e fibroblastos - responsáveis pela regeneração, sintetizam a matriz extracelular e o colágeno. Quando ocorre a lesão, o dano tecidual estimula os fibroblastos a

desempenharem um papel crítico na resposta imune, induzindo a síntese de quimiocinas através da apresentação de receptores em sua superfície. As células imunológicas apresentam sua resposta iniciando uma cascata de eventos para eliminar o tecido morto e microrganismos invasivos. Monnerat (2016) demonstraram que a produção de IL-1 β pelos macrófagos induzia arritmias cardíacas em camundongos diabéticos e sabe-se que durante o IM ocorre um processo inflamatório associado ao estresse oxidativo (SANTANA et al., 2018) e apoptose (WEI et al., 2017). Portanto, o efeito protetor do d-limoneno na IM pode ser atribuído aos referidos mecanismos, a saber, área de fibrose e eventos da inflamação.

5.3. Lesões causadas pelo estresse oxidativo foram reduzidas pelo d-limoneno

Evidências têm apontado o estresse oxidativo como protagonista de lesões durante o IM (PASUPATHY SIVABASKARI et al., 2017). Diversas pesquisas com humanos e animais demonstraram a eficácia de substâncias antioxidantes como adjuvantes no tratamento do IM e terapias farmacológicas baseadas na inibição do estresse oxidativo para evitar a lesão oxidativa são vistas como uma abordagem atrativa para o tratamento da lesão cardíaca induzida por IM (PASUPATHY SIVABASKARI et al., 2017; BRITTO et al., 2018).

Atualmente, o protocolo recomendado pelas entidades de cardiologia envolve a terapia de reperfusão precoce (trombólise e angioplastia/implante de *stent*) para restaurar rapidamente o fluxo coronariano (BETHKE et al., 2015; IBANEZ et al., 2018b). Além disso, a lesão de isquemia e reperfusão, gerada pelo aumento da liberação de EROs, pode ocorrer imediatamente após a restauração da reperfusão, promovendo uma perda incremental das células do miocárdio (YELLON; HAUSENLOY, 2007; ANDERSON; MORROW, 2017). Consequentemente, os possíveis tratamentos adjuvantes à terapia de reperfusão têm como alvo a reperfusão tecidual incompleta com estratégias de vasodilatação regional, por exemplo adenosina e pós-condicionamento isquêmico, ou mais proteção direta da integridade mitocondrial e, portanto, de energia celular (HEUSCH GERD, 2016; LANZA et al., 2016; SANTANA et al., 2018).

Em vista disso, avaliou-se a produção de EROs cardíacas *in situ*, assim como biomarcadores de dano celular causados pelo estresse oxidativo. Na Figura 10, no

painel A (topo), pode-se ver imagens pseudo-coloridas demonstrando a fluorescência *in situ* das EROs. No painel inferior observa-se o gráfico da média da fluorescência, onde pode-se observar que o grupo IM apresentou um aumento da fluorescência de 75% ($p < 0,05$) da formação de EROs quando comparado ao grupo controle. Contudo, os resultados demonstraram que houve redução da geração das EROs para valores do controle com o tratamento do d-limoneno (Figura 10A).

O aumento das EROs (principalmente $O_2^{\bullet-}$) pode levar à lipoperoxidação (GASCHLER; STOCKWELL, 2017). Sabe-se que a membrana plasmática é composta por uma bicamada lipídica - proteínas, carboidratos e fosfolipídios constam em sua composição. A peroxidação lipídica, oxidação de grupos tióis e carbonilação geram alterações na estrutura e permeabilidade das membranas celulares, convergindo para a perda da seletividade na troca iônica e extravasamento do conteúdo de organelas celulares, tais como algumas enzimas hidrolíticas dos lisossomos, formando produtos citotóxicos e culminando em morte celular (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; GOUVEIA et al., 2018).

Mensurou-se a peroxidação lipídica através do método de TBARS, devido a rapidez, simplicidade, eficácia e ampla utilização na mensuração da atividade antioxidante de produtos naturais (BRITTO et al., 2018).

Os resultados demonstraram que a mensuração do TBARS no grupo IM, como esperado, apresentou aumento de 68% ($n = 5$, $*p > 0,05$) em relação ao grupo controle (Figura 10B), sendo que a peroxidação lipídica produzida durante o processo de lesão cardíaca induzida pelo IM foi completamente impedida no grupo tratado com d-limoneno, como pode ser visto na Figura 10B. Esse achado sugere que o d-limoneno protege a camada lipídica das membranas contra os processos oxidativos, contudo, como foi exposto, existem outras estruturas nas membranas que podem sofrer com os processos oxidativos, estruturas estas tão importantes quanto os lipídios para o funcionamento das células.

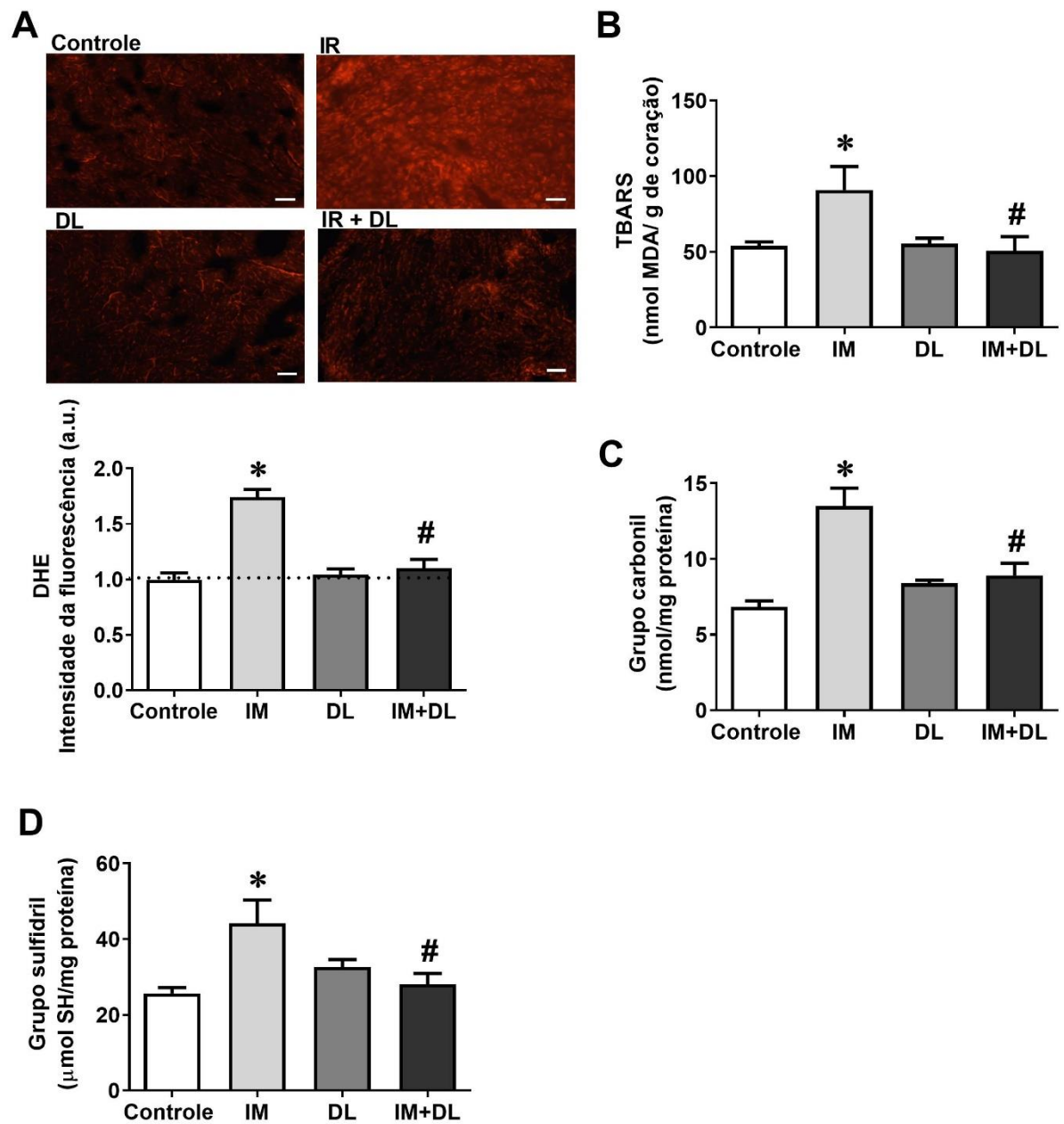


Figura 10. Lesões causadas pelo estresse oxidativo foram reduzidas pelo d-limoneno.

A, Imagens representativas, pseudo-coloridas da fluorescência do DHE (painel superior) e análise quantitativa (painel inferior) ($n = 30$ regiões cardíacas aleatórias analisadas de 5 corações por grupo, barra da escala $25\mu\text{m}$); **B**, mensuração da peroxidação lipídica pela quantificação de MDA; **C**, concentração de sulfidrilização de proteínas; **D**, concentração de carbonilação de proteínas. Os dados foram representados como médias \pm EPM ($n = 5$). * $p < 0,05$ (IM) vs. (Controle); # $p < 0,05$ (DL+IM) vs. (IM). ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey.

Outra região que sofre com as modificações oxidativas na célula são os grupamentos sulfidrilas (SH) e carbonil das proteínas, e podem ser considerados importantes marcadores de estresse oxidativo celular (HIMMELFARB; MCMONAGLE; MCMENAMIN, 2000; MATSUYAMA et al., 2009; GLARBORG; MARSHALL, 2013). Ambas as oxidações desses grupamentos levam a mudanças conformacionais e degradação das proteínas, levando ao aumento e/ou redução de corrente de canais iônicos e enzimas responsáveis pela respiração celular e manutenção da célula, tais como proteína quinase A, proteína quinase C e cálcio/calmodulina quinase II. De fato, diversas modificações pós-traducionais nos grupamentos tiol, encontrado no aminoácido cisteína ou no grupo sulfidril, e oxidação do resíduo de lisina em um grupo carbonila têm sido descritos durante o estado redox excessivo tais como oxidação, nitrosilação, glutationilação, sulfenilação e ligações dissulfeto. Todos esses fatores estão envolvidos e são importantes vias de sinalizações intracelulares durante a disfunção cardíaca causada pelo IM (CHUNG et al., 2013).

Logo, pode-se observar na Figura 10C e D que durante o período de IM houve aumento da carbonilação das proteínas em 97% e do grupo sulfidril em 72% ($n = 5$, $*p > 0,05$) comparado com o controle, tal fato foi revertido com uso do d-limoneno, sendo impedidas tais modificações oxidativas pós-traducionais por completo ($n = 5$, $\#d\text{-limoneno} + \text{IM vs IM}$, $p > 0,05$).

As EROs, além de modificar diretamente as estruturas celulares, também estão envolvidas na regulação da expressão de vários genes (KIM et al., 2003).

Estudos têm relatado o papel das citocinas, quimiocinas, leucócitos e proteínas de fase aguda - como a proteína C-reativa de alta sensibilidade, na patogênese do estresse oxidativo (BOWIE; O'NEILL, 2000; CHUNG et al., 2001). EROs e inflamação estão ligados de uma maneira que é muito difícil de dissecar. No tecido cardíaco, relacionam-se à ativação de múltiplos mecanismos que causam remodelamento do tecido e, portanto, aumentam a suscetibilidade a arritmias (KIM et al., 2003). Esses fenômenos pró-inflamatórios são ativados molecularmente na presença de EROs (VOLTAN et al., 2016). Dentre essas moléculas, uma amplamente estudada é o fator transcricional NF- κ B, um fator que responde a alterações do estado oxidativo celular, isquemia-reperfusão e moléculas inflamatórias (CHANDRA; SAMALI; ORRENIUS, 2000; VOLTAN et al., 2016).

O cofator inibidor (I κ -B) do NF- κ B é fosforilado na presença de EROs, ativando o NF- κ B. Uma vez ativado, o NF- κ B promove a transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória e pró-fibrótica, tais como a IL-6 e os fatores de crescimento TGF- β e TNF- α (CHANDRA; SAMALI; ORRENIUS, 2000; VOLTAN et al., 2016). Essas moléculas atuam em vários tecidos, mas particularmente no coração, produzindo remodelamento da matriz extracelular e fibrose (remodelamento estrutural), o que altera as propriedades eletrofisiológicas do coração. Vários estudos associaram a ativação do NF- κ B com disfunção cardíaca, hipertrofia ventricular e crescimento cardíaco mal-adaptativo (CHANDRA; SAMALI; ORRENIUS, 2000; VOLTAN et al., 2016).

Diversos estudos anteriores demonstraram que o d-limoneno possui ação antioxidante e anti-inflamatória em diversos tecidos não cardíacos (VICTOR ANTONY SANTIAGO et al., 2012; MURALI; KARTHIKEYAN; SARAVANAN, 2013; BAI et al., 2016; BACANLI et al., 2017; YU; YAN; SUN, 2017). Experimentos em fígado de ratos com diabetes tipo 1 induzidos com estreptozotocina, demonstraram que o d-limoneno reduziu os níveis de MDA aumentando significativamente os níveis da atividade das enzimas CAT, SOD e GSH-Px (BACANLI et al., 2017). Outro estudo demonstrou que suplementação com d-limoneno reverteu as alterações induzidas por dois modelos experimentais de doença hepática gordurosa não alcoólica - DHGNA (esteatose hepática não alcoólica) alimentação com alto teor de gordura (*high-fat diet* – HFD) e por N-nitro L-arginina metil éster (L-NAME) que produzem metabólicos induzidos na síndrome associada ao aumento na geração de EROs, sendo a principal causa da cirrose hepática induzida pela DHGNA, e o d-limoneno restaurou a alteração patológica do fígado e do pâncreas e também reduziu os níveis de MDA (VICTOR ANTONY SANTIAGO et al., 2012).

O d-limoneno também demonstrou ter importantes propriedades imunomoduladoras, sendo capaz de aliviar asma e alergias. Além disso, foi observado efeitos anti-inflamatórios em modelo de rato com colite ulcerativa. O d-limoneno reduziu os níveis de expressão de NF- κ B, TNF- α , IL-1 β e IL-6, indicando o seu potencial antioxidante e propriedades anti-inflamatórias (YU; YAN; SUN, 2017).

No presente estudo, observou-se que o IM causa produção aumentada de EROs, com consequentes lipoperoxidação e oxidação proteica. Pôde-se verificar que o d-limoneno reduziu as modificações da lipoperoxidação e carbonilação de proteínas

em modelo de IM induzida por isoproterenol, logo, investigou-se as enzimas antioxidantes para saber se o d-limoneno atua por esse mecanismo em modelo de IM.

5.4. *D-limoneno restaura a atividade da SOD na lesão cardíaca induzida por IM*

Para melhor compreender os mecanismos pelos quais o d-limoneno reduziu o dano produzido pelo estresse oxidativo na lesão por IM, avaliou-se a atividade das enzimas antioxidantes endógenas SOD e CAT. Conforme pode-se observar na Figura 11A, a lesão por IM promoveu redução da SOD (-55%, $n = 5$, $*p < 0,05$) comparado ao grupo controle, contudo, no grupo d-limoneno + IM houve aumento da SOD a valores normais ($24,35 \pm 3,87$ U/mg proteína, $n = 5$, $\#p > 0,05$) quando comparados ao grupo IM. Entretanto, não houve alteração da atividade da CAT ($n = 5$, Figura 11B) em nenhum dos grupos.

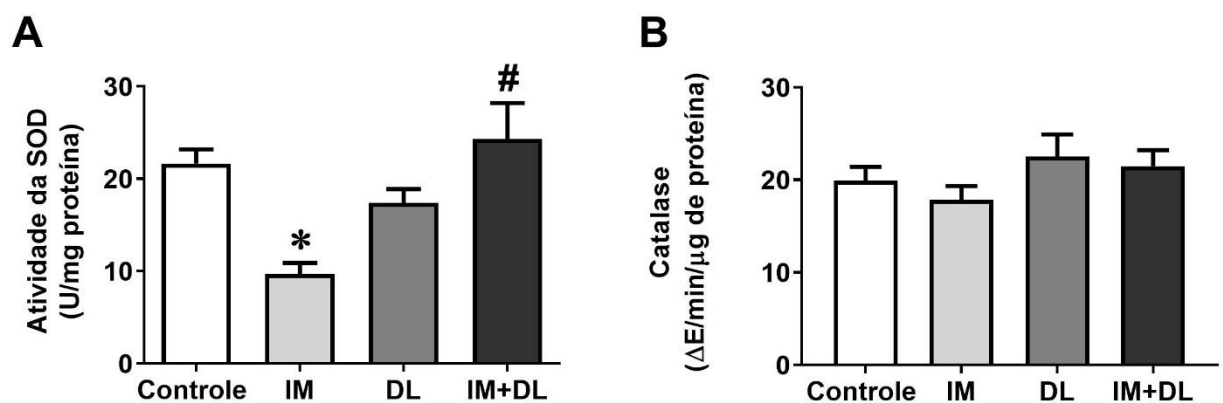


Figura 11. D-limoneno restaura a atividade da SOD na lesão cardíaca induzida por IM.

A, atividade de superóxido dismutase (SOD); **B**, atividade da catalase. Os dados foram representados como médias \pm EPM ($n = 5$). * $p < 0,05$ (IM) vs. (Controle); # $p < 0,05$ (DL+IM) vs. (IM). ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey.

Estudos com os monoterpenos carvacrol (25, 50 e 100 mg/kg; i.p.) e mirtenol (50 mg/kg; v.o.) em ratos *Wistar* observaram aumento na atividade das enzimas CAT e SOD e redução na formação de MDA (tratamento por 7 dias consecutivos em modelo de IR cardíaca *ex-vivo* por isquemia global no sistema de perfusão aórtica do tipo langendorff) (CHEN et al., 2017; BRITTO et al., 2018). Outros trabalhos com ratos pré-tratados por 3 dias consecutivos com ginsenoside Rb3 (5,10 e 20 mg/kg, V.O.) e asperosaponina VI (5, 10 e 20 25 mg/kg, I.V.) demonstraram a redução da formação

de MDA e aumento da atividade da CAT e SOD no tecido cardíaco, protegendo das lesões envolvidas no infarto do miocárdio (LI et al., 2010; SHI et al., 2011).

Nossos resultados não apresentaram redução da CAT no grupo IM; todavia sabe-se que em resposta a exposição às EROs o organismo, a fim de obter um efeito cardioprotetor durante o período de isquemia miocárdica, apresenta o mecanismo compensatório de aumento na atividade de enzimas e expressão de proteínas que estão associadas ao sistema de defesa antioxidante (RODRIGO et al., 2013).

O estresse oxidativo no IM induzido por ISO promove lesão cardíaca devido ao desbalanço nos sistemas pró e antioxidante (DÍAZ-MUÑOZ et al., 2006) e, nesse ponto, é interessante ressaltar que pesquisas demonstraram diferentes intensidades na atividade da catalase no referido contexto. Esse efeito pode ser explicado devido a grande quantidade de $O_2^{\circ-}$ nas primeiras horas após a IM, levando à inibição da SOD e CAT e, após 24 h do IM, segue-se a normalização na atividade da CAT na tentativa de restabelecer as condições basais de H_2O_2 (DÍAZ-MUÑOZ et al., 2006; PENDERGRASS KARL D. et al., 2011).

O mecanismo molecular responsável por essa mudança adaptativa que envolve o aumento da atividade antioxidante é (parcialmente) o Nrf2 (fator 2 relacionado ao fator nuclear-eritróide 2). O Nrf2 é normalmente encontrado no citosol e quando oxidado sofre translocação nuclear. No núcleo, Nrf2 estimula o aumento da expressão de enzimas antioxidantes (KOBAYASHI; YAMAMOTO, 2005; ZHU et al., 2008), tais como CAT, GSH-Px, glutathione redutase, tornando a via de sinalização Nrf2 um mecanismo importante para a citoproteção miocárdica (KOBAYASHI; YAMAMOTO, 2005; ZHU et al., 2008). É interessante notar que os níveis de EROs podem ser responsáveis pela ativação das vias NF- κ B e Nrf2.

Nossos resultados suportam a hipótese de que a cardioproteção induzida pelo d-limoneno pode ser mediada pela inibição da formação de EROs. A SOD transforma o radical $O_2^{\circ-}$ em uma forma menos danosa às células, o peróxido de hidrogênio, sendo este então eliminado por catalase e peroxidases ou liberado para as células e utilizado por fagócitos, contudo, em altas concentrações, possui efeito deletério às células (HAYYAN; HASHIM; ALNASHEF, 2016).

O $O_2^{\circ-}$ possui alta capacidade oxidativa (GASCHLER; STOCKWELL, 2017) e pôde-se verificar que o d-limoneno reduziu a fluorescência pelo DHE, que marca principalmente o $O_2^{\circ-}$. Ainda, o d-limoneno também reduziu a lipoperoxidação, sendo esta causada principalmente pelo $O_2^{\circ-}$. Medindo a atividade da enzima, foi observado

maior atividade no grupo tratado com d-limoneno, sendo assim, até o presente momento, podemos constatar que o d-limoneno atua de forma a aumentar a atividade da SOD, reduzindo os efeitos lesivos do $O_2^{\circ-}$.

Para avaliar a capacidade do d-limoneno em atuar como antioxidante não enzimático, foi utilizado o método FRAP (Fator Antioxidante Redutor Férrico - *ferric reducing antioxidant power*) que se baseia na redução pelos antioxidantes do complexo íon férrico-TPTZ (2,4,6-tri (2-piridil) - 1,3,5-triazina) (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). Como pode ser visto na Figura 12 não houve alteração em nenhum dos grupos experimentais, indicando que o d-limoneno, neste modelo de IM, não atua como antioxidante não enzimático.

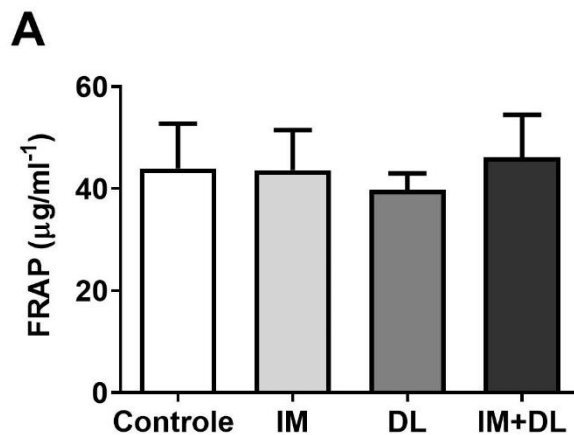


Figura 12. Atividade do fator antioxidante redutor férrico (FRAP). Os dados foram representados como médias \pm EPM ($n = 4-5$). ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.5. D-limoneno suprime via pró-apoptótica cardíaca induzida por lesão de IM

Múltiplas linhas de evidências demonstram que o estresse oxidativo promove a ativação de vias pró-apoptóticas. Sendo assim, foi investigado ação do d-limoneno sobre a relação Bax/Bcl após a lesão cardíaca (Figura 13A - D).

Na Figura 13A observamos a imagem representativa da expressão proteica do Bax, Bcl-2 e do GAPDH (a proteína GAPDH foi usada como controle, pois não se altera durante o tratamento). Podemos observar que o grupo IM aumentou a expressão da proteína Bax em 46,78% (Figura 13B, $n = 4$, * $p < 0,05$) em relação ao

controle, sendo que o tratamento com d-limoneno reduziu a Bax a parâmetros iguais ao controle ($p > 0,05$). Contudo não houve alteração na expressão da proteína Bcl-2 (Figura 13C, $n = 4$, $p > 0,05$).

Ainda, observa-se que a IM induziu aumento da relação Bax/Bcl-2 em $78,5 \pm 17,65\%$, conforme mostrado na Figura 13D, o que foi totalmente revertido pelo tratamento com o d-limoneno ($n = 4$, $^{\#}p < 0,05$). A relação Bax/Bcl-2 é uma medida do equilíbrio das vias pró e antiapoptóticas, tal relação indica que o tratamento com d-limoneno promove cardioproteção por inibir a ativação da via pró-apoptótica. Na Figura 13E - F podemos observar que a pró-caspase-3 apresentou redução no grupo IM ($45,61 \pm 4,37\%$, $^*p < 0,05$). Nesse ponto, faz-se importante mencionar que a referida proteína, pró-caspase-3, encontra-se inativada. Assim, quando há diminuição em sua medida, assume-se que a maior parte da proteína está ativada. No grupo tratado com d-limoneno, a expressão da pró-caspase-3 foi restaurada, não havendo diferença quando comparado com o grupo controle ($n = 5$).

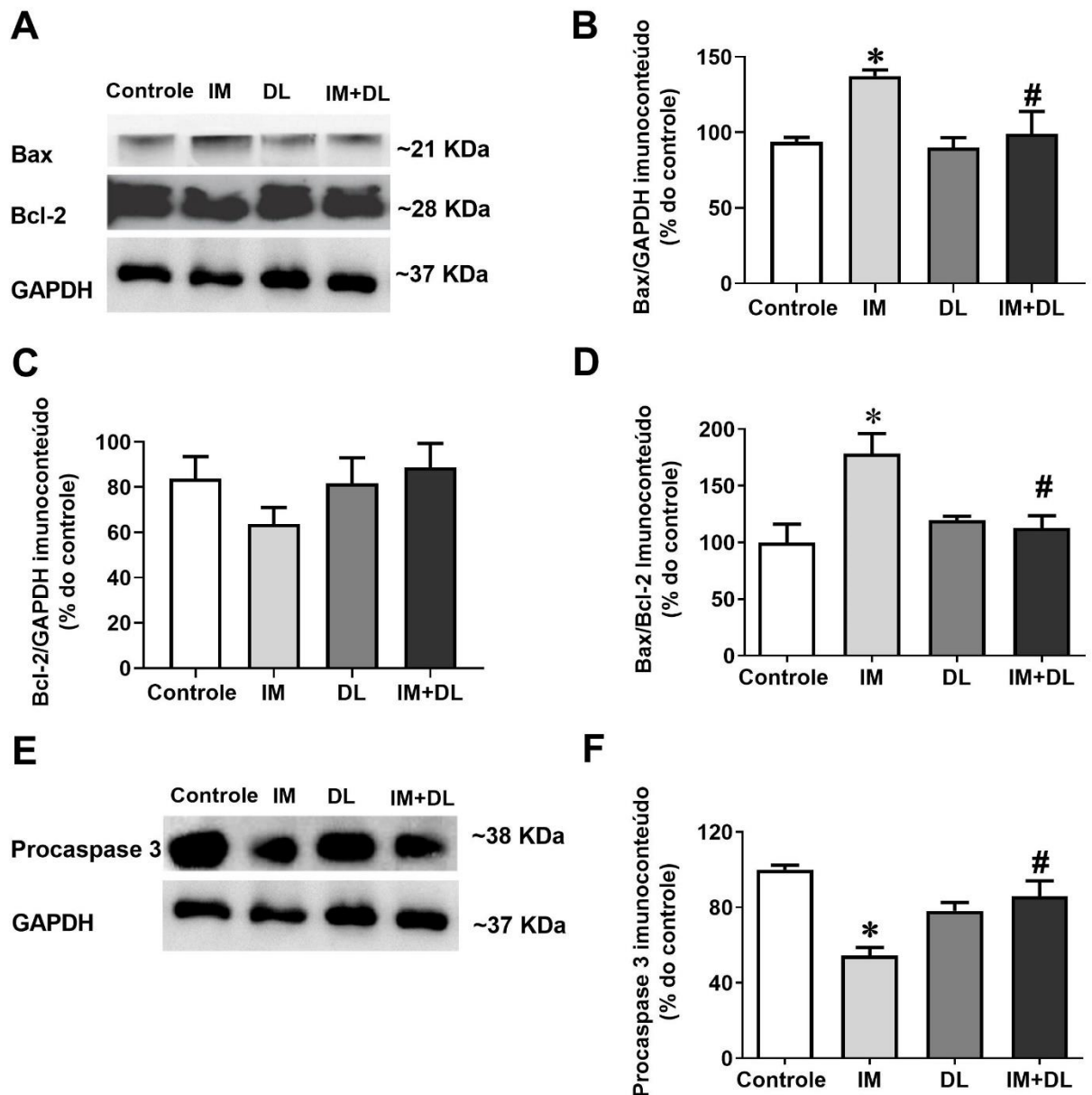


Figura 13. D-limoneno suprime via pró-apoptótica cardíaca induzida por lesão de IM. **A**, a imagem representativa da expressão proteica do Bax, Bcl-2 e do GAPDH; **B**, análise quantitativa da relação Bax/GAPDH; **C**, análise quantitativa da relação Bcl-2/GAPDH; **D**, relação Bax / Bcl-2; **E**, imagem representativa da expressão proteica da procaspase 3 e β actina; **F**, análise quantitativa da expressão proteica para caspase-3. Os dados foram representados como médias \pm EPM (n = 5). * p < 0,05 (IM) vs. (Controle); #p < 0,05 (DL+IM) e vs. (IM). ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey.

Diversos pesquisadores têm investigado a via de apoptose durante o processo de IM induzida pelo isoproterenol. Os resultados mostram que a administração de isoproterenol em ratos resultou na regulação positiva das expressões de proteínas de

sinalização pró-apoptóticas do miocárdio, incluindo Bax, caspase-3, caspase-9, citocromo C e P53, e regulação negativa da expressão Bcl-2. Durante o processo de apoptose, o estresse oxidativo pode influenciar as mitocôndrias e os lisossomas a ativar vias pró-apoptóticas (OTHMAN et al., 2017; TASATARGIL et al., 2017; ZHANG; LI; GE, 2017; YU et al., 2018).

Bax é um promotor de apoptose, sob a influência de estímulos apoptóticos, como o estresse oxidativo, o Bax pode causar a liberação do citocromo C e estimular a morte celular programada (SAHU et al., 2014). Bcl-2 é um membro anti-apoptótico, capturando EROs dentro das células e reprimindo a liberação do citocromo C no citoplasma. Ambos desempenham papéis importantes na regulação da via apoptótica (CHANG et al., 2015). As enzimas caspases, incluindo caspase-3 e caspase-9, também desempenham um papel essencial no processo de apoptose (ZHANG; LI; GE, 2017) - a caspase-3 ativada causa apoptose no estágio final.

Os nossos resultados convergem com os de outros trabalhos e sugerem que o tratamento com d-limoneno promove redução da via pró-apoptótica (Bax e caspase-3) induzida pela IM (BAI et al., 2016; VERMA et al., 2019). Sabe-se que a sobrevivência celular depende do balanço da regulação das vias pró e antiapoptóticas, e no presente trabalho demonstrou-se que o d-limoneno restaurou completamente o equilíbrio das proteínas pró e antiapoptóticas (razão Bax/Bcl-2). Zhang (2017), também demonstrou que após o tratamento com crocetina (substância natural encontrada na flor do açafrão), o nível de caspase-3 e Bax diminuiu significativamente e o Bcl-2 aumentou nos tecidos miocárdicos de ratos com IM em comparação com o grupo IM sem tratamento (BAI et al., 2016; ZHANG; LI; GE, 2017).

Nos últimos anos, a compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação das vias de sinalização da apoptose evoluiu significativamente. No entanto, muitas questões importantes permanecem sem resposta. Isso inclui maior esclarecimento dos elos moleculares que desencadeiam a transição entre a sobrevivência celular e a morte celular para cada uma das vias de sinalização do receptor de morte envolvendo as EROs.

As EROs desempenham um papel central na sinalização celular e na regulação das principais vias de apoptose mediadas pelas mitocôndrias. As EROs também estão envolvidas em outras vias reguladoras de sobrevivência e morte celular, como autofagia. A desregulação dessas diferentes vias de sobrevivência e morte celular provavelmente terá consequências patológicas importantes para doenças associadas

ao estresse oxidativo, como câncer (KUMARI et al., 2018), doenças neurodegenerativas (KIM et al., 2015), lesão por isquemia-reperfusão evidenciada no IM (BRITTO et al., 2018) e diabetes (FAKHRUDDIN; ALANAZI; JACKSON, 2017). Avanços em nossa compreensão de como diferentes sensores de estresse, como as EROs, permitem uma mudança da sobrevivência para a morte devem levar a novas estratégias para prevenir ou tratar algumas dessas doenças.

6. CONCLUSÃO

O trabalho evidencia os efeitos cardioprotetores do d-limoneno em modelo de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em coração de camundongo Swiss. O d-limoneno impede as alterações eletrocardiográficas - elevação do segmento ST, aumento do intervalo QTc e frequência cardíaca. Atua também na redução da área de infarto, prevenção de alterações histológicas como descontinuidade, degeneração, espaçamento amplo e vacuolações, diminuição do dano oriundo do estresse oxidativo – diminui geração de EROs, restaura a atividade da SOD, diminui oxidação de proteínas e lipídios. No que se refere ao equilíbrio das vias pró e antiapoptóticas, essencial à sobrevivência do organismo, o tratamento com d-limoneno exhibe supressão da via pró-apoptótica.

Os achados do presente estudo indicam que as ações farmacológicas do d-limoneno, na concentração de 10 μ M, ocorrem por promover efeito anti-apoptótico, reduzindo a área de infarto e a produção de EROs, aumentando a atividade da SOD e reduzindo as enzimas pró-apoptóticas (Bax e caspase-3).

REFERÊNCIAS

- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in Thiol Content and Expression of Glutathione Redox System Genes in the Hippocampus and Cerebellum in Alzheimer's Disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, n. 2–3, p. 141–145, 20 abr. 2001.
- ALAM, Md. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, Md. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143–152, 1 abr. 2013.
- ALGHATRIF, M.; LINDSAY, J. A brief review: history to understand fundamentals of electrocardiography. **Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives**, v. 2, n. 1, 30 abr. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3714093/>>. Acesso em: 17 nov. 2018.
- ALVES-SILVA, J. M. et al. Protective Effects of Terpenes on the Cardiovascular System: Current Advances and Future Perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 40, p. 4559–4600, 2016.
- ANDERSON, J. L.; MORROW, D. A. Acute Myocardial Infarction. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 21, p. 2053–2064, 25 maio 2017.
- ARAÚJO-FILHO, H. G. et al. D-limonene exhibits superior antihyperalgesic effects in a β -cyclodextrin-complexed form in chronic musculoskeletal pain reducing Fos protein expression on spinal cord in mice. **Neuroscience**, v. 358, p. 158–169, 2017.
- AYDIN, Y. et al. Hypotensive Effects of Carvacrol on the Blood Pressure of Normotensive Rats. **Planta Medica**, v. 73, n. 13, p. 1365–1371, out. 2007.
- BACANLI, M. et al. D-limonene ameliorates diabetes and its complications in streptozotocin-induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 110, p. 434–442, 2017.
- BAI, J. et al. **Protective Effect of D-Limonene against Oxidative Stress-Induced Cell Damage in Human Lens Epithelial Cells via the p38 Pathway**. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/5962832/>>. Acesso em: 1 jan. 2019.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, fev. 2006.
- BASTOS, J. F. A. et al. Hypotensive and Vasorelaxant Effects of Citronellol, a Monoterpene Alcohol, in Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, n. 4, p. 331–337, abr. 2010.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 15 jul. 1996.
- BERS, D. M. Cardiac Excitation-Contraction Coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198–205, 10 jan. 2002.

BETHKE, A. et al. Myocardial Perfusion Grade Predicts Final Infarct Size and Left Ventricular Function in Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction Treated with a Pharmaco-Invasive Strategy (Thrombolysis and Early Angioplasty). **EuroIntervention: Journal of EuroPCR in Collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology**, v. 11, n. 5, p. 518–524, set. 2015.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9, dez. 2012.

BOWIE, A.; O'NEILL, L. A. Oxidative Stress and Nuclear Factor-KappaB Activation: A Reassessment of the Evidence in the Light of Recent Discoveries. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 13–23, 1 jan. 2000.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRADY, W. J.; MORRIS, F. Electrocardiographic Abnormalities Encountered in Acute Myocardial Infarction. **Emergency Medicine Journal**, v. 17, n. 1, p. 40–45, 1 jan. 2000.

BRITTO, R. M. de et al. Myrtenol protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through antioxidant and anti-apoptotic dependent mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 111, p. 557–566, 1 jan. 2018.

BROOKS, W. W.; CONRAD, C. H. Isoproterenol-Induced Myocardial Injury and Diastolic Dysfunction in Mice: Structural and Functional Correlates. **Comparative Medicine**, v. 59, n. 4, p. 339–343, ago. 2009.

BURCU, G. B. et al. The protective cardiac effects of B-myrcene after global cerebral ischemia/reperfusion in C57BL/J6 mouse. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 31, n. 7, p. 456–462, jul. 2016.

CERVANTES GRACIA, K.; LLANAS-CORNEJO, D.; HUSI, H. CVD and Oxidative Stress. **Journal of Clinical Medicine**, v. 6, n. 2, 20 fev. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5332926/>>. Acesso em: 27 dez. 2018.

CHAGOYA DE SÁNCHEZ, V. et al. Sequential Changes of Energy Metabolism and Mitochondrial Function in Myocardial Infarction Induced by Isoproterenol in Rats: A Long-Term and Integrative Study. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 75, n. 12, p. 1300–1311, dez. 1997.

CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and Modulation of Apoptosis by Oxidative Stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n. 3–4, p. 323–333, ago. 2000.

CHANG, J. W. et al. Protective Effect of Artemisia Asiatica (Pamp.) Nakai Ex Kitam Ethanol Extract against Cisplatin-Induced Apoptosis of Human HaCaT Keratinocytes: Involvement of NF-Kappa B- and Bcl-2-Controlled Mitochondrial Signaling.

Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, v. 22, n. 6, p. 679–688, 1 jun. 2015.

CHEN, Y. et al. Role of carvacrol in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of MAPK/ERK and Akt/eNOS signaling pathways. **European Journal of Pharmacology**, v. 796, p. 90–100, 5 fev. 2017.

CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. D-Limonene Rich Volatile Oil from Blood Oranges Inhibits Angiogenesis, Metastasis and Cell Death in Human Colon Cancer Cells. **Life Sciences**, v. 91, n. 11–12, p. 429–439, 5 out. 2012.

CHOE, Y. et al. Changes in Oxygen Consumption and Heart Rate After Acute Myocardial Infarction During 6-Month Follow-Up. **PM&R**, v. 10, n. 6, p. 587–593, 1 jun. 2018.

CHUNG, H. S. et al. Cysteine Oxidative Posttranslational Modifications: Emerging Regulation in the Cardiovascular System. **Circulation Research**, v. 112, n. 2, p. 382–392, 18 jan. 2013.

CHUNG, M. K. et al. C-Reactive Protein Elevation in Patients with Atrial Arrhythmias: Inflammatory Mechanisms and Persistence of Atrial Fibrillation. **Circulation**, v. 104, n. 24, p. 2886–2891, 11 dez. 2001.

CONCEIÇÃO, A. L. A EXPANSÃO DO AGRONEGÓCIO NO CAMPO DE SERGIPE. **Revista GeoNordeste**, v. 0, n. 2, 2011. Disponível em: <<https://seer.ufs.br/index.php/geonordeste/article/view/2412>>. Acesso em: 31 mar. 2018.

DA FONSECA, C. O. et al. Efficacy of Monoterpene Perillyl Alcohol upon Survival Rate of Patients with Recurrent Glioblastoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 137, n. 2, p. 287–293, fev. 2011.

DATASUS. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>>. Acesso em: 26 dez. 2018.

DE MENEZES-FILHO, J. E. R. et al. Geraniol Blocks Calcium and Potassium Channels in the Mammalian Myocardium: Useful Effects to Treat Arrhythmias. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 115, n. 6, p. 534–544, dez. 2014.

DEBIŃSKI, M.; KONDYS, M.; BUSZMAN, P. E. Risk Assessment in Patients with ST Elevation Myocardial Infarction Treated with Primary Percutaneous Coronary Angioplasty. Does Reduced Duration of Hospital Stay Affect the Prognosis? **Kardiologia Polska**, v. 75, n. 7, p. 635–640, 2017.

DEKKER, J. M. et al. QTc Duration Is Associated with Levels of Insulin and Glucose Intolerance. The Zutphen Elderly Study. **Diabetes**, v. 45, n. 3, p. 376–380, mar. 1996.

DEMAUREX, N.; ROSSELIN, M. Redox Control of Mitochondrial Calcium Uptake. **Molecular Cell**, v. 65, n. 6, p. 961–962, 16 mar. 2017.

DHALLA, N. S.; TEMSAH, R. M.; NETTICADAN, T. Role of Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. **Journal of Hypertension**, v. 18, n. 6, p. 655–673, jun. 2000.

DÍAZ-MUÑOZ, M. et al. Correlation between Oxidative Stress and Alteration of Intracellular Calcium Handling in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 289, n. 1–2, p. 125–136, set. 2006.

EISNER, D. A. et al. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. **Circulation Research**, v. 121, n. 2, p. 181–195, 7 jul. 2017.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of Aldehydic Lipid Peroxidation Products: Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407–421, 1990.

FAKHRUDDIN, S.; ALANAZI, W.; JACKSON, K. E. **Diabetes-Induced Reactive Oxygen Species: Mechanism of Their Generation and Role in Renal Injury**. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jdr/2017/8379327/>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

FESTA, A. et al. Relation of Systemic Blood Pressure, Left Ventricular Mass, Insulin Sensitivity, and Coronary Artery Disease to QT Interval Duration in Nondiabetic and Type 2 Diabetic Subjects. **The American Journal of Cardiology**, v. 86, n. 10, p. 1117–1122, 15 nov. 2000.

FRANK, A. et al. Myocardial ischemia reperfusion injury - from basic science to clinical bedside. **Seminars in cardiothoracic and vascular anesthesia**, v. 16, n. 3, p. 123–132, set. 2012.

GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Special Issue on Cell Death in Honor of Sten Orrenius. v. 482, n. 3, p. 419–425, 15 jan. 2017.

GLARBORG, P.; MARSHALL, P. Oxidation of Reduced Sulfur Species: Carbonyl Sulfide. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 45, n. 7, p. 429–439, 2013.

GODARD, D. P. Kamatou, G.P.P., Viljoen, A.M. 2010. A Review Of The Application And Pharmacological Properties Of α -bisabolol And α -bisabolol-rich Oils. **Journal Of The American Oil Chemists' Society** 87: 1-7. Disponível em: <http://www.alvaroviljoen.com/Project_247_publications.html>. Acesso em: 27 dez. 2018.

GOUVEIA, D. N. et al. α -Terpineol reduces cancer pain via modulation of oxidative stress and inhibition of iNOS. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 652–661, 1 set. 2018.

GOYAL, S. N. et al. Preventive effect of crocin of *Crocus sativus* on hemodynamic, biochemical, histopathological and ultrastructural alterations in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. **Phytomedicine**, v. 17, n. 3, p. 227–232, 1 mar. 2010.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of Mitochondrial Oxidative Damage as a Therapeutic Strategy in Diabetes. **Diabetes**, v. 53 Suppl 1, p. S110-118, fev. 2004.

Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology - 13th Edition. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/books/guyton-and-hall-textbook-of-medical-physiology/hall/978-1-4557-7005-2>>. Acesso em: 23 mar. 2019.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring Reactive Species and Oxidative Damage in Vivo and in Cell Culture: How Should You Do It and What Do the Results Mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231–255, maio 2004.

HARA, M.; KISHIMOTO, M.; KUBOI, T. Changes of D-Limonene Content in Three Citrus Species during Fruit Development. **Food Science and Technology Research**, v. 5, n. 1, p. 80–81, 1999.

HAUSENLOY, D. J.; YELLON, D. M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 1, p. 92–100, 2 jan. 2013.

HAYYAN, M.; HASHIM, M. A.; ALNASHEF, I. M. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 5, p. 3029–3085, 9 mar. 2016.

HEUSCH GERD. The Coronary Circulation as a Target of Cardioprotection. **Circulation Research**, v. 118, n. 10, p. 1643–1658, 13 maio 2016.

HIMMELFARB, J.; MCMONAGLE, E.; MCMENAMIN, E. Plasma Protein Thiol Oxidation and Carbonyl Formation in Chronic Renal Failure. **Kidney International**, v. 58, n. 6, p. 2571–2578, dez. 2000.

HUANG, H. et al. Protective effect of scutellarin on myocardial infarction induced by isoprenaline in rats. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n. 3, p. 267–276, mar. 2018.

IBANEZ, B. et al. 2017 ESC Guidelines for the Management of Acute Myocardial Infarction in Patients Presenting with ST-Segment ElevationThe Task Force for the Management of Acute Myocardial Infarction in Patients Presenting with ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). **European Heart Journal**, v. 39, n. 2, p. 119–177, 7 jan. 2018a.

IBANEZ, B. et al. 2017 ESC Guidelines for the Management of Acute Myocardial Infarction in Patients Presenting with ST-Segment ElevationThe Task Force for the Management of Acute Myocardial Infarction in Patients Presenting with ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). **European Heart Journal**, v. 39, n. 2, p. 119–177, 7 jan. 2018b.

JAIN, P. G. et al. Cardioprotective Role of FA against Isoproterenol Induced Cardiac Toxicity. **Molecular Biology Reports**, v. 45, n. 5, p. 1357–1365, out. 2018.

KIANI, J. et al. Relationship of Electro-mechanical Remodeling to Survival Rates after Cardiac Resynchronization Therapy. **Texas Heart Institute Journal**, v. 40, n. 3, p. 268–273, 2013.

KIM, G. H. et al. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Experimental Neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325–340, dez. 2015.

KIM, Y. H. et al. Gene Expression Profiling of Oxidative Stress on Atrial Fibrillation in Humans. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 35, n. 5, p. 336, out. 2003.

KIRKMAN, H. N. et al. Mechanisms of Protection of Catalase by NADPH. Kinetics and Stoichiometry. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 20, p. 13908–13914, 14 maio 1999.

KOBAYASHI, M.; YAMAMOTO, M. Molecular Mechanisms Activating the Nrf2-Keap1 Pathway of Antioxidant Gene Regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 3–4, p. 385–394, abr. 2005.

KOMIYA, M.; TAKEUCHI, T.; HARADA, E. Lemon Oil Vapor Causes an Anti-Stress Effect via Modulating the 5-HT and DA Activities in Mice. **Behavioural Brain Research**, v. 172, n. 2, p. 240–249, 25 set. 2006.

KUMARI, S. et al. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. **Biomarker Insights**, v. 13, 6 fev. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5808965/>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

LAHLOU, S. et al. Cardiovascular Effects of 1,8-Cineole, a Terpenoid Oxide Present in Many Plant Essential Oils, in Normotensive Rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 1125–1131, dez. 2002.

LANZA, G. A. et al. Effect of Remote Ischemic Preconditioning on Coronary Procedure-Related Impairment of Vascular Dilator Function. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 68, n. 22, p. 2490–2492, 6 dez. 2016.

LAPCZYNSKI, A. et al. Fragrance Material Review on Farnesol. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46 Suppl 11, p. S149-156, nov. 2008.

LESNEFSKY, E. J. et al. Mitochondrial Dysfunction and Myocardial Ischemia-Reperfusion: Implications for Novel Therapies. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 57, n. 1, p. 535–565, 6 jan. 2017.

LI, C. et al. Protective roles of Asperosaponin VI, a triterpene saponin isolated from *Dipsacus asper* Wall on acute myocardial infarction in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 627, n. 1, p. 235–241, 10 fev. 2010.

LOBO FILHO, H. G. et al. Experimental model of myocardial infarction induced by isoproterenol in rats. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 26, n. 3, p. 469–476, set. 2011.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 5 dez. 2014.

MADESH, M.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Microtiter Plate Assay for Superoxide Dismutase Using MTT Reduction by Superoxide. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 35, n. 3, p. 184–188, jun. 1998.

MALATESTA, M. Histological and Histochemical Methods - Theory and Practice. **European Journal of Histochemistry : EJH**, v. 60, n. 1, 29 fev. 2016. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4800257/>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

MAßBERG, D. et al. Monoterpene (-)-Citronellal Affects Hepatocarcinoma Cell Signaling via an Olfactory Receptor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 566, p. 100–109, 15 jan. 2015.

MATSUYAMA, Y. et al. Albumin Thiol Oxidation and Serum Protein Carbonyl Formation Are Progressively Enhanced with Advancing Stages of Chronic Kidney Disease. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 13, n. 4, p. 308–315, 1 ago. 2009.

MENEZES-FILHO, J. E. R. de et al. **Nerol Attenuates Ouabain-Induced Arrhythmias**. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2019/5935921/>>. Acesso em: 27 abr. 2019.

MONNERAT, G. et al. Macrophage-Dependent IL-1 β Production Induces Cardiac Arrhythmias in Diabetic Mice. **Nature Communications**, v. 7, p. 13344, 24 nov. 2016.

MORADI-ARZELOO, M. et al. Effects of histidine and vitamin C on isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. **Veterinary Research Forum**, v. 7, n. 1, p. 47–54, 2016.

MORIS, D. et al. The Role of Reactive Oxygen Species in Myocardial Redox Signaling and Regulation. **Annals of Translational Medicine**, v. 5, n. 16, 18 jun. 2017. Disponível em: <<http://atm.amegroups.com/article/view/15293>>. Acesso em: 26 dez. 2018.

MURALI, R.; KARTHIKEYAN, A.; SARAVANAN, R. Protective Effects of D-Limonene on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 112, n. 3, p. 175–181, mar. 2013.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25° C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Analytical Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 474–478, 1 out. 1972.

NEUMANN, F.-J. et al. 2018 ESC/EACTS Guidelines on Myocardial Revascularization. **European Heart Journal**, v. 40, n. 2, p. 87–165, 7 jan. 2019.

NOUR, M. S. et al. Histological and Immunohistochemical Study of Cardiac Telocytes in a Rat Model of Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction with a Reference to the Effect of Grape Seed Extract. **Acta Histochemica**, v. 119, n. 7, p. 747–758, set. 2017.

O'CONNELL, K. E. et al. Practical Murine Hematopathology: A Comparative Review and Implications for Research. **Comparative Medicine**, v. 65, n. 2, p. 96–113, abr. 2015.

O'GARA, P. T. et al. 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction: Executive Summary. **Circulation**, v. 127, n. 4, p. 529 LP – 555, 29 jan. 2013.

OOI, D. S.; ISOTALO, P. A.; VEINOT, J. P. Correlation of Antemortem Serum Creatine Kinase, Creatine Kinase-MB, Troponin I, and Troponin T with Cardiac Pathology. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 338–344, mar. 2000.

OTHMAN, A. I. et al. Epigallocatechin-3-Gallate Prevents Cardiac Apoptosis by Modulating the Intrinsic Apoptotic Pathway in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction. **European Journal of Pharmacology**, v. 794, p. 27–36, 5 jan. 2017.

PASTORE, C. A. et al. III DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA SOBRE ANÁLISE E EMISSÃO DE LAUDOS ELETROCARDIOGRÁFICOS. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 106, n. 4, p. 1–23, abr. 2016.

PASUPATHY SIVABASKARI et al. Early Use of N-acetylcysteine With Nitrate Therapy in Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention for ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction Reduces Myocardial Infarct Size (the NACIAM Trial [N-acetylcysteine in Acute Myocardial Infarction]). **Circulation**, v. 136, n. 10, p. 894–903, 5 set. 2017.

PAZOUKI, L.; NIINEMETS, Ü. Multi-Substrate Terpene Synthases: Their Occurrence and Physiological Significance. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 12 jul. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4940680/>>. Acesso em: 26 dez. 2018.

PENDERGRASS KARL D. et al. Temporal Effects of Catalase Overexpression on Healing After Myocardial Infarction. **Circulation: Heart Failure**, v. 4, n. 1, p. 98–106, 1 jan. 2011.

PIEGAS, L. et al. V DIRETRIZ DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA SOBRE TRATAMENTO DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO COM SUPRADESNÍVEL DO SEGMENTO ST. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 105, n. 2, 2015. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/abc.20150107>>. Acesso em: 25 dez. 2018.

PINELLI, A. et al. Pretreatment with Tetrandrine Has Protective Effects against Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rabbits. **In Vivo (Athens, Greece)**, v. 24, n. 3, p. 265–270, jun. 2010.

PORTER, B. et al. Beat-to-Beat Variability of Ventricular Action Potential Duration Oscillates at Low Frequency During Sympathetic Provocation in Humans. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 4 abr. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5893843/>>. Acesso em: 17 nov. 2018.

PREDA, M. B.; BURLACU, A. Electrocardiography as a Tool for Validating Myocardial Ischemia-Reperfusion Procedures in Mice. **Comparative Medicine**, v. 60, n. 6, p. 443–447, dez. 2010.

PRISCILLA, D. H.; PRINCE, P. S. M. Cardioprotective Effect of Gallic Acid on Cardiac Troponin-T, Cardiac Marker Enzymes, Lipid Peroxidation Products and Antioxidants in Experimentally Induced Myocardial Infarction in Wistar Rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, n. 2–3, p. 118–124, 15 maio 2009.

PULTRINI, A. de M.; GALINDO, L. A.; COSTA, M. Effects of the Essential Oil from Citrus Aurantium L. in Experimental Anxiety Models in Mice. **Life Sciences**, v. 78, n. 15, p. 1720–1725, 6 mar. 2006.

RAUTAHARJU, P. M. et al. Correlates of QT Prolongation in Older Adults (the Cardiovascular Health Study). **American Journal of Cardiology**, v. 73, n. 13, p. 999–1002, 15 maio 1994.

REDAKTION. **D-Limonene in citrus fruit with anticarcinogenic action**. Disponível em: <<https://www.ernaehrungs-umschau.de/print-artikel/15-07-2003-d-limonene-in-citrus-fruit-with-anticarcinogenic-action/>>. Acesso em: 28 dez. 2018.

ROBBINS, J. et al. The Association between the Length of the QT Interval and Mortality in the Cardiovascular Health Study. **The American Journal of Medicine**, v. 115, n. 9, p. 689–694, 15 dez. 2003.

ROBERTO, D. et al. Antioxidant Activity of Limonene on Normal Murine Lymphocytes: Relation to H₂O₂ Modulation and Cell Proliferation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, n. 1, p. 38–44, jan. 2010.

RODRIGO, R. et al. Oxidative Stress-Related Biomarkers in Essential Hypertension and Ischemia-Reperfusion Myocardial Damage. **Disease Markers**, v. 35, n. 6, p. 773–790, 2013.

RONA, G. Catecholamine Cardiotoxicity. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 17, n. 4, p. 291–306, abr. 1985.

SAHU, B. D. et al. Cardioprotective Effect of Embelin on Isoproterenol-Induced Myocardial Injury in Rats: Possible Involvement of Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis. **Life Sciences**, v. 107, n. 1–2, p. 59–67, 27 jun. 2014.

SANTANA, M. N. S. et al. Resistance Exercise Mediates Remote Ischemic Preconditioning by Limiting Cardiac ENOS Uncoupling. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 125, p. 61–72, 1 dez. 2018.

SANTOS, M. R. V. et al. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 764–771, ago. 2011.

SCHWARTZ PETER J.; CROTTI LIA; INSOLIA ROBERTO. Long-QT Syndrome. **Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology**, v. 5, n. 4, p. 868–877, 1 ago. 2012.

SERONDE, M. F. et al. Discharge Heart Rate and Mortality after Acute Myocardial Infarction. **The American Journal of Medicine**, v. 127, n. 10, p. 954–962, out. 2014.

SHEN, M. et al. Resveratrol Attenuates Ischemia/Reperfusion Injury in Neonatal Cardiomyocytes and Its Underlying Mechanism. **PLOS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51223, 20 dez. 2012.

SHI, Y. et al. Ginsenoside Rb3 ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 9, p. 900–906, 1 set. 2011.

SINNING, C.; WESTERMANN, D.; CLEMMENSEN, P. Oxidative Stress in Ischemia and Reperfusion: Current Concepts, Novel Ideas and Future Perspectives. **Biomarkers in Medicine**, v. 11, n. 11, p. 11031–11040, nov. 2017.

SOUZA, A. A. de et al. Terpenos com aplicação cardiovascular. **Revista GEINTEC - Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 2, p. 1948–1954, 9 jun. 2015.

SUBRAMANIAN, B. ECG Signal Classification and Parameter Estimation Using Multiwavelet Transform. 2017. Disponível em: <<http://www.biomedres.info/abstract/ecg-signal-classification-and-parameter-estimation-using-multiwavelet-transform-6995.html>>. Acesso em: 17 nov. 2018.

SUCHAL, K. et al. Kampeferol protects against oxidative stress and apoptotic damage in experimental model of isoproterenol-induced cardiac toxicity in rats. **Phytomedicine**, v. 23, n. 12, p. 1401–1408, 15 nov. 2016.

SUN, J. D-limonene: Safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n. 3, p. 259–264, 2007.

TASATARGIL, A. et al. Cardioprotective effect of nesfatin-1 against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats: Role of the Akt/GSK-3 β pathway. **Peptides**, v. 95, p. 1–9, 1 set. 2017.

THYGESEN, K. et al. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 60, n. 16, p. 1581–1598, 16 out. 2012.

THYGESEN KRISTIAN et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). **Circulation**, v. 138, n. 20, p. e618–e651, 13 nov. 2018.

TRENOR, B. et al. Cardiac action potential repolarization revisited: early repolarization shows all-or-none behaviour. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 21, p. 6599–6612, 1 nov. 2017.

TURER, A. T.; HILL, J. A. Pathogenesis of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Rationale for Therapy. **The American journal of cardiology**, v. 106, n. 3, p. 360–368, 1 ago. 2010.

TYAN, L. et al. Long QT Syndrome Caveolin-3 Mutations Differentially Modulate Kv 4 and Cav 1.2 Channels to Contribute to Action Potential Prolongation. **The Journal of Physiology**, 27 dez. 2018.

VERMA, N. et al. In Vitro Studies on Ameliorative Effects of Limonene on Cadmium-Induced Genotoxicity in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 4, p. 1384–1397, abr. 2019.

VICTOR ANTONY SANTIAGO, J. et al. Dietary D-Limonene Alleviates Insulin Resistance and Oxidative Stress-Induced Liver Injury in High-Fat Diet and L-NAME-Treated Rats. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 1, p. 57–68, fev. 2012.

VIRMANI, R.; FORMAN, M. B.; KOLODIE, F. D. Myocardial Reperfusion Injury. Histopathological Effects of Perfluorochemical. **Circulation**, v. 81, n. 3 Suppl, p. IV57–68, mar. 1990.

VOLTAN, R. et al. Redox signaling and oxidative stress: Cross talk with TNF-related apoptosis inducing ligand activity. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxidative Stress. v. 81, p. 364–374, 1 dez. 2016.

WANG, X.; LI, G.; SHEN, W. Protective effects of D-Limonene against transient cerebral ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 1, p. 699–706, jan. 2018.

WEI, H. et al. Cardioprotective Effects of Malvidin Against Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rats: A Mechanistic Study. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 23, p. 2007–2016, 26 abr. 2017.

WHO | World Heart Day. Disponível em: <http://www.who.int/cardiovascular_diseases/world-heart-day/en/>. Acesso em: 29 abr. 2019.

WONG, C. X. et al. Epidemiology of Sudden Cardiac Death: Global and Regional Perspectives. **Heart, Lung & Circulation**, v. 28, n. 1, p. 6–14, jan. 2019.

YELLON, D. M.; HAUSENLOY, D. J. Myocardial Reperfusion Injury. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 11, p. 1121–1135, 13 set. 2007.

YU, L.; YAN, J.; SUN, Z. D-Limonene Exhibits Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties in an Ulcerative Colitis Rat Model via Regulation of INOS, COX-2, PGE2 and ERK Signaling Pathways. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 4, p. 2339–2346, abr. 2017.

YU, Y. et al. Cardioprotective Effect of Rosuvastatin against Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction Injury in Rats. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, n. 6, p. 3509–3516, jun. 2018.

ZHANG, W.; LI, Y.; GE, Z. Cardioprotective Effect of Crocetin by Attenuating Apoptosis in Isoproterenol Induced Myocardial Infarction Rat Model. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 93, p. 376–382, set. 2017.

ZHU, H. et al. Nuclear Factor E2-Related Factor 2-Dependent Myocardial Cytoprotection against Oxidative and Electrophilic Stress. **Cardiovascular Toxicology**, v. 8, n. 2, p. 71–85, 2008.

ZUCCHI R et al. Effect of ischemia and reperfusion on cardiac ryanodine receptors--sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channels. **Circulation Research**, v. 74, n. 2, p. 271–280, 1 fev. 1994.